



FACULTAD DE CIENCIAS

GRADOS DE BIOTECNOLOGÍA Y DE INGENIERÍA QUÍMICA



TRABAJO FIN DE GRADO

**DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO NO INVASIVO PARA LA
DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE PROTECCIÓN DE CREMAS SOLARES.
FABRICACIÓN DE UNA CREMA A PARTIR DE MICROALGAS Y EL DISEÑO DE
SU PROCESO DE PRODUCCIÓN.**

AUTOR:

D. JAVIER OUTÓN PORRAS

JULIO, 2019



FACULTAD DE CIENCIAS

GRADOS DE BIOTECNOLOGÍA Y DE INGENIERÍA QUÍMICA



TRABAJO FIN DE GRADO

**DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO NO INVASIVO PARA LA
DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE PROTECCIÓN DE CREMAS SOLARES.
FABRICACIÓN DE UNA CREMA A PARTIR DE MICROALGAS Y EL DISEÑO DE
SU PROCESO DE PRODUCCIÓN.**

AUTOR:

D. JAVIER OUTÓN PORRAS

TUTOR:

D. EDUARDO BLANCO OLLERO

DEPARTAMENTO DE FÍSICA DE LA MATERIA CONDENSADA

DÑA. MARÍA DOLORES MACÍAS SÁNCHEZ

DEPARTAMENTO INGENIERÍA QUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

FIRMA DEL ALUMNO.

Titulación: GIQ+GBT

Título: Diseño y validación de un método no invasivo para la determinación del factor de protección de cremas solares. Fabricación de una crema a partir de microalgas y el diseño de su proceso de pro (nueva propuesta)

Curso: 2018/2019

Tutor1: eduardo.blanco@uca.es (FISICA DE LA MATERIA CONDENSADA)

Tutor2: dolores.macias@uca.es, (INGENIERIA QUIMICA Y TECN. DE ALIMENTOS)

Carácter: Proyecto de Ingeniería Química

Descripción:

El uso masivo de protectores solares de base química tiene un gran impacto en el entorno marino de nuestras costas. En este proyecto se pretende diseñar y elaborar un protector solar libre de compuestos químicos de impacto ambiental y también que pudieran resultar dañinos a medio plazo para nuestra piel.

Como primer objetivo general se pretende diseñar un método puramente óptico para la determinación del factor de protección de una crema solar, basado en la norma UNE-EN ISO 24443 que especifica un procedimiento in vitro para caracterizar la protección UVA de los protectores solares. Para ello se trabajará con un espectrofotómetro UV-Vis-NIR equipado con esfera integradora. Dicho método se validará tanto mediante la caracterización de una colección de cremas comerciales así como la de una preparación estándar, validada para este fin por la FOOD AND DRUG ADMINISTRATION DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (USA).

Un segundo objetivo de este proyecto, centrado ya en la fabricación de un nuevo protector solar, incluye el dimensionamiento de las unidades necesarias de una planta para la producción de 25 kg/año de biomasa microalgal, concretamente de *Anabaena* sp. necesaria para la elaboración de protectores solares biológicos. Se dimensionarán el sistema de producción de biomasa (fotobiorreactores), empleando los parámetros cinéticos obtenidos en la fase experimental, conjuntamente con el mejor proceso de estresado seleccionado. Asimismo, se dimensionarán los procesos que constituirían el downstream; separación, lavado y secado de la biomasa.

Se tendrá en cuenta el Reglamento (CE) n.1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre los productos cosméticos.

El alcance del proyecto abarca el diseño y dimensionamiento de las unidades necesarias para satisfacer el objetivo marcado, la obtención de biomasa húmeda y seca de *Anabaena* sp. para su posterior uso en la formulación de protectores solares biológico

Alumno propuesto: Javier Outón Porras javi.outonporras@alum.uca.es

Curso: 2018/2019

Fecha: 29/10/2018 16:58:54

Es propuesta de alumno: NO; Aceptada profesor: SÍ; Aceptada depto.: SÍ;
Aceptada comisión: SÍ.

Agradecimientos:

Se acerca el final de una etapa, dura a la vez que bonita, con momentos muy buenos y momentos no tan buenos, aunque con un claro balance positivo. Y es que todo lo logrado, no lo podría haber conseguido sin la ayuda y el apoyo de mis padres, que siempre han estado ahí, cuando hacía falta y cuando no, cuando todo iba muy bien o cuando las cosas se torcían un poco. Nunca han faltado unas palabras de ánimo, apoyo y comprensión. Por todos esos detalles, que han hecho estos cinco años muy amenos. ¡Os quiero, papás!

Tampoco puedo olvidarme de mis hermanos, porque sin ellos nada hubiera sido posible porque, aunque uno esté terminando la carrera y otro empezando la ESO, nunca falta esa ayuda mutua.

También quiero darles las gracias a mis tutores del TFG, Loli y Eduardo, por ponerme las cosas tan fáciles y siempre preocupándose por mí. Especialmente me gustaría darte las gracias a ti, Eduardo, por contar siempre conmigo desde que era un chico intentando descubrir qué era esto de la universidad y por hacer todo lo posible por meterme en el mundillo este que tanto me gusta. ¡Has sido como un padre para mí! También me gustaría darle las gracias a Carmen y Perales porque, aunque no habéis sido mis tutores, no habéis dudado en ayudarme con todo lo que a las microalgas se refiere.

Y si Eduardo ha sido como un padre, mi madre dentro la facultad ha sido Gema. Gracias por ayudarnos siempre que teníamos algún problema con horarios o asignaturas, por pelear por nosotros y porque si esto ha salido hacia adelante, es en gran parte mérito tuyo. También agradecer a todas las personas que, directa o indirectamente, han puesto su granito de arena para que podamos estar, a día de hoy, entregando un TFG de Biología e Ingeniería Química.

Y, por último, pero no menos importante, a todos los amigos que he hecho a lo largo de estos 5 años, que han conseguido con pequeños gestos que hayan sido 5 años magníficos. Especialmente a mis Ingenieros Biotec, por lo vivido y por lo que queda por vivir ¡muchas gracias!

ÍNDICE

| | |
|--|----------|
| Documento I: Memoria | 1 |
| 1. Resumen | 3 |
| 2. Abstract | 5 |
| 3. Objeto y alcance | 7 |
| 4. Definiciones y abreviaturas | 9 |
| 4.1. Definiciones | 9 |
| 4.2. Abreviaturas | 10 |
| 5. Antecedentes | 11 |
| 5.1. ¿Productos naturales o químicos? | 11 |
| 5.2. Necesidad de protección | 12 |
| 5.3. Composición de los protectores solares | 13 |
| 5.4. Medición del factor de protección solar | 14 |
| 5.4.1. Cálculo matemático del SPF | 14 |
| 5.4.2. Importancia de la medición del SPF | 15 |
| 5.5. Efectos de los protectores solares en los ecosistemas marinos | 16 |
| 5.6. Elaboración de protectores solares biológicos | 19 |
| 5.6.1. Cianobacterias | 19 |
| 5.6.2. Utilidad de las cianobacterias | 20 |
| 5.6.3. Concepto y funciones de las micosporinas | 20 |
| 5.6.4. Descubrimiento de las micosporinas | 21 |
| 5.6.5. Micosporinas como componentes de protectores solares | 22 |
| 5.6.6. Aumento inducido en la producción de micosporinas | 23 |
| 5.6.7. <i>Anabaena sp.</i> | 23 |
| 6. Desarrollo experimental | 25 |
| 6.1. Medición del Factor de Protección Solar | 25 |
| 6.1.1. Equipos y materiales utilizados | 25 |
| 6.1.2. Aplicación del producto para la medición | 26 |
| 6.1.3. Validación del método | 26 |
| 6.1.4. Medición del SPF de protectores solares comerciales | 29 |
| 6.2. Estudio de la cinética de crecimiento de <i>Anabaena sp.</i> | 30 |
| 6.2.1. Inicio del cultivo y seguimiento | 30 |
| 6.2.2. Preparación de los medios de cultivo | 31 |
| 6.2.3. Obtención de la relación Absorbancia-Concentración microalgal | 31 |
| 6.2.4. Obtención de la cinética de crecimiento | 34 |
| 6.3. Optimización de la producción de micosporinas | 37 |
| 6.3.1. Estresado de las microalgas | 38 |
| 6.3.2. Dosis aplicada | 38 |
| 6.3.3. Estudio sobre la aplicación de las dosis | 39 |
| 6.4. Cuantificación de la cantidad de micosporinas | 40 |
| 6.4.1. Preparación de la biomasa previa a la extracción | 40 |
| 6.4.2. Extracción de micosporinas | 41 |
| 6.4.3. Cuantificación de la cantidad de micosporinas | 41 |

| | |
|--|-----------|
| 6.5. Elaboración del protector solar | 43 |
| 7. Conclusiones experimentales | 45 |
| 8. Requisitos de diseño | 47 |
| 9. Resultados de diseño | 49 |
| 9.1. Crecimiento de la biomasa | 49 |
| 9.1.1. Elección del sistema del cultivo | 49 |
| 9.1.2. Factores a tener en cuenta a la hora de operar un fotobiorreactor | 50 |
| 9.1.3. Dimensionamiento del Fotobiorreactor | 54 |
| 9.1.4. Número de fotobiorreactores | 55 |
| 9.1.5. Material del fotobiorreactor | 57 |
| 9.2. Estresado de la biomasa | 57 |
| 9.2.1. Fotobiorreactores para el estresado | 57 |
| 9.2.2. Equipo para el estresado por radiación UVB | 58 |
| 9.3. Procesos de cosechado y secado de la biomasa | 59 |
| 9.3.1. Obtención de la biomasa húmeda | 60 |
| 9.3.2. Obtención de la biomasa seca | 61 |
| 9.4. Tanques de almacenamiento | 62 |
| 9.4.1. Equipo utilizado | 62 |
| 9.4.2. Esterilización del medio de cultivo | 62 |
| 9.4.3. Agitación del medio de cultivo | 63 |
| 9.5. Agitación de los cultivos | 63 |
| 9.5.1. Compresor | 63 |
| 9.5.2. Aporte de CO ₂ | 64 |
| 9.6. Sistema de bombas, tuberías y accesorios | 65 |
| 9.6.1. Tuberías para líquidos y gases | 65 |
| 9.6.2. Bombas | 66 |
| 9.6.3. Accesorios | 68 |
| 9.6.4. Pérdida de carga en tuberías y accesorios | 69 |
| 9.6.5. Potencia de bomba necesaria | 71 |
| 9.7. Dimensiones de la planta piloto | 71 |
| 9.8. Planificación | 72 |
| 9.9. Optimización y mejoras del proceso | 73 |
| 9.10. Aplicación final de los resultados | 75 |
| 10. Planificación | 76 |
| 11. Normas y referencias | 77 |
| Documento II: Anexos | 83 |
| 1. Anexo I: Valores de transmitancia de protectores solares en el rango 290-400 nm | 85 |
| 2. Anexo II: Rectas de calibrado Absorbancia – Concentración | 88 |
| 3. Anexo III: Cinética de Crecimiento | 90 |
| 4. Anexo IV: Composición de los medios de cultivo | 98 |
| 5. Anexo V: Concentración de MAAs | 100 |
| 6. Anexo VI: Factores que afectan al crecimiento celular | 122 |
| 7. Anexo VII: Cultivo de microalgas | 128 |
| 8. Anexo VIII: Cálculos de intensidades luminosas | 136 |

| | |
|--|------------|
| 9. Anexo IX: Dimensiones del fotobiorreactor | 138 |
| 10. Anexo X: Número de fotobiorreactores | 140 |
| 11. Anexo XI: Materiales de los fotobiorreactores | 143 |
| 12. Anexo XII: Fotobiorreactor para el estresado celular | 145 |
| 13. Anexo XIII: Equipo destinado al estresado celular | 146 |
| 14. Anexo XIV: Obtención de biomasa húmeda | 151 |
| 15. Anexo XV: Obtención de biomasa seca | 157 |
| 16. Anexo XVI: Tanque de almacenamiento | 160 |
| 17. Anexo XVII: Sistema de esterilización | 161 |
| 18. Anexo XVIII: Aireación | 163 |
| 19. Anexo XIX: Tuberías y accesorios | 166 |
| 20. Anexo XX: Bombas | 171 |
| 21. Anexo XXI: Relación de RedField | 176 |
| 22. Anexo XXII: Arcón congelador | 178 |
| 23. Anexo XXIII: Paneles LED | 179 |
| 24. Anexo XXII: Impacto ambiental | 180 |
| Documento III: Planos | 183 |
| Documento IV: Pliego de Condiciones | 193 |
| 1. Condiciones generales | 195 |
| 1.1. Objetivo del Pliego de Condiciones | 195 |
| 1.2. Cuerpo normativo | 195 |
| 1.3. Documentos del Proyecto | 196 |
| 2. Condiciones facultativas | 199 |
| 2.1. Disposiciones generales | 199 |
| 2.2. Términos del Pliego de Condiciones | 199 |
| 2.3. Dirección Facultativa | 200 |
| 2.4. El Contratista | 201 |
| 2.5. Facultades en la Dirección de la Obra | 202 |
| 2.6. Libro de Órdenes | 202 |
| 2.7. Reclamaciones contra la Dirección | 202 |
| 2.8. Inicio del trabajo | 203 |
| 2.9. Replanteo | 203 |
| 2.10. Ejecución de las obras | 204 |
| 2.11. Maquinaria y otros equipos empleados | 204 |
| 2.12. Puesta a punto y prueba de funcionamiento | 204 |
| 2.13. Materiales | 205 |
| 2.14. Control de calidad | 206 |
| 2.15. Ensayos | 206 |
| 2.16. Almacenamiento | 206 |
| 2.17. Mejoras de obra | 207 |
| 2.18. Partidas de alzada | 207 |
| 2.19. Recepción provisional de las obras | 207 |
| 2.20. Periodo de garantías | 207 |
| 2.21. Recepción definitiva | 207 |

| | |
|--|-----|
| 2.22. Documento final de la obra | 208 |
| 3. Condiciones económicas | 209 |
| 3.1. Principios generales | 209 |
| 3.2. Fianzas | 209 |
| 3.3. Precios | 210 |
| 3.3.1. Composición de los precios unitarios | 210 |
| 3.3.2. Precios contradictorios | 211 |
| 3.3.3. Reclamación de aumento de precios | 211 |
| 3.3.4. Revisión de los precios contratados | 211 |
| 3.4. Elementos comprendidos en el presupuesto | 211 |
| 3.5. Valoración y abono de los trabajos | 212 |
| 3.6. Indemnizaciones por demora | 212 |
| 3.7. Penalizaciones | 213 |
| 3.8. Gastos de obra | 213 |
| 3.9. Seguros y conservación de la obra | 213 |
| 3.10. Condiciones de pago | 214 |
| 4. Condiciones legales | 215 |
| 4.1. Disposiciones legales | 215 |
| 4.2. El Contratista | 215 |
| 4.3. Leyes laborales | 216 |
| 4.4. Mano de obra | 216 |
| 4.5. Daños en propiedades vecinas | 217 |
| 4.6. Contrato | 217 |
| 4.6.1. Rescisión de Contrato | 217 |
| 4.6.2. Formalizaciones del Contrato | 218 |
| 4.7. Adjudicación | 218 |
| 4.8. Subcontratas | 218 |
| 4.9. Accidentes de trabajo | 218 |
| 5. Condiciones técnicas | 219 |
| 5.1. Disposiciones de carácter particular | 219 |
| 5.2. Materiales de construcción | 219 |
| 5.3. Materiales para la fabricación de equipos | 219 |
| 5.4. Equipos y maquinarias | 227 |
| 5.5. Condiciones de ejecución | 227 |
| 5.6. Especificaciones particulares de los equipos | 227 |
| 5.6.1. Fotobiorreactores para el crecimiento de la biomasa | 228 |
| 5.6.2. Fotobiorreactores de estresado | 228 |
| 5.6.3. Bombas | 228 |
| 5.6.4. Centrífuga | 229 |
| 5.6.5. Liofilizador | 229 |
| 5.6.6. Lámparas UVB para el estresado | 229 |
| 5.6.7. Especificaciones de los depósitos | 229 |
| 5.6.8. Especificaciones del sistema de esterilización | 229 |
| 5.6.9. Compresor de aire | 229 |

| | |
|---|------------|
| Documento V: Presupuesto | 231 |
| 1. Introducción | 233 |
| 2. Presupuesto de Ejecución Material (PEM) | 233 |
| 3. Presupuesto de Ejecución por Contrata (PEC) | 236 |
| 4. Presupuesto de Ejecución General (PEG) | 236 |
| 5. Costes anuales | 237 |
| 5.1. Costes anuales de compuestos químicos para el medio de cultivo | 237 |
| 5.2. Coste anual de consumo energético | 238 |
| 5.3. Coste anual de la mano de obra | 239 |
| 5.4. Costes anuales totales | 239 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1- Composición del protector estándar de homosalato | 26 |
| Tabla 2- Valor de SPF de diferentes protectores comerciales | 29 |
| Tabla 3- Datos para la recta de calibrado de <i>Anabaena sp.</i> Marina | 33 |
| Tabla 4- Datos para la recta de calibrado de <i>Anabaena sp.</i> Continental | 33 |
| Tabla 5- Parámetros de la modelización de la cinética de crecimiento de <i>Anabaena sp.</i> marina | 36 |
| Tabla 6- Parámetros de la modelización de la cinética de crecimiento de <i>Anabaena sp.</i> continental | 36 |
| Tabla 7- Experimentos de estresado realizado | 39 |
| Tabla 8- Concentración final de MAAs en los diferentes experimentos realizados | 42 |
| Tabla 9- Composición del protector solar elaborado | 43 |
| Tabla 10- Dimensiones del fotobiorreactor para el crecimiento celular | 55 |
| Tabla 11- Datos para el cálculo del número de fotobiorreactores para el crecimiento celular | 56 |
| Tabla 12- Dimensiones de los fotobiorreactores para el estresado | 58 |
| Tabla 13- Características de la lámpara UVB para el estresado | 58 |
| Tabla 14- Características de estresado a escala de planta piloto | 59 |
| Tabla 15- Características de la centrífuga | 60 |
| Tabla 16- Características del liofilizador | 61 |
| Tabla 17- Dimensiones del tanque de almacenamiento | 62 |
| Tabla 18- Características del compresor | 64 |
| Tabla 19- Condiciones de los conductos de aire | 66 |
| Tabla 20- Características de los modelos de bombas peristálticas I12 e I17 | 68 |
| Tabla 21- Circuitos de tuberías y accesorios | 69 |
| Tabla 22- Pérdida de carga en tuberías | 69 |
| Tabla 23- Pérdida de carga en accesorios | 70 |
| Tabla 24- Pérdida de carga total en cada circuito | 70 |
| Tabla 25- Pérdida de carga en la conducción de gases | 70 |
| Tabla 26- Potencia de bomba necesaria | 71 |
| Tabla A1- Transmitancias de los protectores solares respecto a la longitud de onda | 85 |
| Tabla A2- Datos para la elaboración de la recta de calibrado de <i>Anabaena sp.</i> marina (Parte 1) | 88 |
| Tabla A3- Datos para la elaboración de la recta de calibrado de <i>Anabaena sp.</i> marina (Parte 2) | 88 |
| Tabla A4- Datos para la elaboración de la recta de calibrado de <i>Anabaena sp.</i> continental (Parte 1) | 89 |
| Tabla A5- Datos para la elaboración de la recta de calibrado de <i>Anabaena sp.</i> continental (Parte 2) | 89 |
| Tabla A6- Datos de concentración de biomasa frente a tiempo del reactor AS1 | 90 |
| Tabla A7- Parámetros cinéticos obtenidos del biorreactor AS1 | 91 |
| Tabla A8- Datos de concentración de biomasa frente a tiempo del reactor AS2 | 91 |

| | |
|---|-----|
| Tabla A9- Parámetros cinéticos obtenidos del biorreactor AS2 | 92 |
| Tabla A10- Datos de concentración de biomasa frente a tiempo del reactor AS3 | 93 |
| Tabla A11- Parámetros cinéticos obtenidos del biorreactor AS3 | 94 |
| Tabla A12- Datos de concentración de biomasa frente a tiempo del reactor AD1 | 94 |
| Tabla A13- Parámetros cinéticos obtenidos del biorreactor AD1 | 95 |
| Tabla A14- Datos de concentración de biomasa frente a tiempo del reactor AD2 | 95 |
| Tabla A15- Parámetros cinéticos obtenidos del biorreactor AD2 | 96 |
| Tabla A16- Datos de concentración de biomasa frente a tiempo del reactor AD3 | 96 |
| Tabla A17- Parámetros cinéticos obtenidos del biorreactor AD3 | 97 |
| Tabla A18- Composición del medio F2 de Guillard | 98 |
| Tabla A19- Solución de elementos traza del medio F2 de Guillard | 98 |
| Tabla A20- Solución de vitaminas del medio F2 de Guillard | 98 |
| Tabla A21- Solución A del medio de cultivo no marino | 99 |
| Tabla A22- Solución B del medio de cultivo no marino | 99 |
| Tabla A23- Solución C del medio de cultivo no marino | 99 |
| Tabla A24- Solución D del medio de cultivo no marino | 99 |
| Tabla A25- Extracción de MAAs de <i>Anabaena sp.</i> continental sin estresar (1) | 100 |
| Tabla A26- Extracción de MAAs de <i>Anabaena sp.</i> continental sin estresar (2) | 100 |
| Tabla A27- Extracción de MAAs de <i>Anabaena sp.</i> continental sin estresar (3) | 101 |
| Tabla A28- Extracción de MAAs de <i>Anabaena sp.</i> continental sin estresar (4) | 101 |
| Tabla A29- Extracción de MAAs de <i>Anabaena sp.</i> continental sin estresar (5) | 102 |
| Tabla A30- Extracción de MAAs de <i>Anabaena sp.</i> continental sin estresar (6) | 102 |
| Tabla A31- Extracción de MAAs de <i>Anabaena sp.</i> continental sin estresar (7) | 103 |
| Tabla A32- Extracción de MAAs de <i>Anabaena sp.</i> marina sin estresar (1) | 103 |
| Tabla A33- Extracción de MAAs de <i>Anabaena sp.</i> marina sin estresar (2) | 104 |
| Tabla A34- Extracción de MAAs de <i>Anabaena sp.</i> marina sin estresar (3) | 104 |
| Tabla A35- Extracción de MAAs de <i>Anabaena sp.</i> marina sin estresar (4) | 105 |
| Tabla A36- Extracción de MAAs de <i>Anabaena sp.</i> marina sin estresar (5) | 105 |
| Tabla A37- Extracción con metanol de MAAs de <i>Anabena sp.</i> continental, dosis=51,84 kJ, Q=3,525 L/h | 106 |
| Tabla A38- Extracción con acetona de MAAs de <i>Anabena sp.</i> continental, dosis=51,84 kJ, Q=3,525 L/h | 106 |
| Tabla A39- Extracción con metanol de MAAs de <i>Anabena sp.</i> continental, dosis=51,84 kJ, Q=7,05 L/h | 107 |
| Tabla A40- Extracción con acetona de MAAs de <i>Anabena sp.</i> continental, dosis=51,84 kJ, Q=7,05 L/h | 107 |
| Tabla A41- Extracción con metanol de MAAs de <i>Anabena sp.</i> continental, dosis=51,84 kJ, Q=10,575 L/h | 108 |
| Tabla A42- Extracción con acetona de MAAs de <i>Anabena sp.</i> continental, dosis=51,84 kJ, Q=10,575 L/h | 108 |
| Tabla A43- Extracción con metanol de MAAs de <i>Anabena sp.</i> continental, dosis=51,84 kJ, Q=14,1 L/h | 109 |
| Tabla A44- Extracción con acetona de MAAs de <i>Anabena sp.</i> continental, dosis=51,84 kJ, Q=14,1 L/h | 109 |

| | |
|--|-----|
| Tabla A45- Extracción con metanol de MAAs de <i>Anabena sp.</i> continental, dosis=25,92 kJ, Q=3,525 L/h | 110 |
| Tabla A46- Extracción con acetona de MAAs de <i>Anabena sp.</i> continental, dosis=25,92 kJ, Q=3,525 L/h | 110 |
| Tabla A47- Extracción con metanol de MAAs de <i>Anabena sp.</i> continental, dosis=25,92 kJ, Q=7,05 L/h | 111 |
| Tabla A48- Extracción con acetona de MAAs de <i>Anabena sp.</i> continental, dosis=25,92 kJ, Q=7,05 L/h | 111 |
| Tabla A49- Extracción con metanol de MAAs de <i>Anabena sp.</i> continental, dosis=25,92 kJ, Q=10,575 L/h | 112 |
| Tabla A50- Extracción con acetona de MAAs de <i>Anabena sp.</i> continental dosis=25,92 kJ, Q=10,575 L/h | 112 |
| Tabla A51- Extracción con metanol de MAAs de <i>Anabena sp.</i> continental, dosis=25,92 kJ, Q=14,1 L/h | 113 |
| Tabla A52- Extracción con acetona de MAAs de <i>Anabena sp.</i> continental, dosis=25,92 kJ, Q=14,1 L/h | 113 |
| Tabla A53- Extracción con metanol de MAAs de <i>Anabena sp.</i> marina, dosis=51,84 kJ, Q=3,525 L/h | 114 |
| Tabla A54- Extracción con acetona de MAAs de <i>Anabena sp.</i> marina, dosis=51,84 kJ, Q=3,525 L/h | 114 |
| Tabla A55- Extracción con metanol de MAAs de <i>Anabena sp.</i> marina, dosis=51,84 kJ, Q=7,05 L/h | 115 |
| Tabla A56- Extracción con acetona de MAAs de <i>Anabena sp.</i> marina, dosis=51,84 kJ, Q=7,05 L/h | 115 |
| Tabla A57- Extracción con metanol de MAAs de <i>Anabena sp.</i> marina, dosis=51,84 kJ, Q=10,575 L/h | 116 |
| Tabla A58- Extracción con acetona de MAAs de <i>Anabena sp.</i> marina dosis=51,84 kJ, Q=10,575 L/h | 116 |
| Tabla A59- Extracción con metanol de MAAs de <i>Anabena sp.</i> marina, dosis=51,84 kJ, Q=14,1 L/h | 117 |
| Tabla A60- Extracción con acetona de MAAs de <i>Anabena sp.</i> marina, dosis=51,84 kJ, Q=14,1 L/h | 117 |
| Tabla A61- Extracción con metanol de MAAs de <i>Anabena sp.</i> marina, dosis=25,92 kJ, Q=3,525 L/h | 118 |
| Tabla A62- Extracción con acetona de MAAs de <i>Anabena sp.</i> marina, dosis=25,92 kJ, Q=3,525 L/h | 118 |
| Tabla A63- Extracción con metanol de MAAs de <i>Anabena sp.</i> marina, dosis=25,92 kJ, Q=7,05 L/h | 119 |
| Tabla A64- Extracción con acetona de MAAs de <i>Anabena sp.</i> marina, dosis=25,92 kJ, Q=7,05 L/h | 119 |
| Tabla A65- Extracción con metanol de MAAs de <i>Anabena sp.</i> marina, dosis=25,92 kJ, Q=10,575 L/h | 120 |
| Tabla A66- Extracción con acetona de MAAs de <i>Anabena sp.</i> marina, dosis=25,92 kJ, Q=10,575 L/h | 120 |

| | |
|--|-----|
| Tabla A67- Extracción con metanol de MAAs de <i>Anabena sp.</i> marina, dosis=25,92 kJ, Q=14,1 L/h | 121 |
| Tabla A68- Extracción con acetona de MAAs de <i>Anabena sp.</i> marina, dosis=25,92 kJ, Q=14,1 L/h | 121 |
| Tabla A69- Radiación PAR en Cádiz en 2016 | 136 |
| Tabla A70- Radiación PAR en Praga en 2016 | 137 |
| Tabla A71- Relaciones geométricas de reactores airlift de tubos concéntricos escogidas por diferentes autores | 138 |
| Tabla A72- Dimensiones del fotobiorreactor para crecimiento | 139 |
| Tabla A73- Datos técnicos de las lámparas UVB destinadas al estresado celular | 147 |
| Tabla A74- Características de interés de las dos lámparas UVB | 148 |
| Tabla A75- Datos técnicos de la centrífuga BTPX 305 | 155 |
| Tabla A76- Datos físicos (aproximado) de la centrífuga BTPX 305 | 155 |
| Tabla A77- Dimensiones principales (aproximado) de la centrífuga BTPX 305 | 155 |
| Tabla A78- Utilidades de consumo de la centrífuga BTPX 305 | 156 |
| Tabla A79- Datos técnicos liofilizador Lyolab 3.0 | 159 |
| Tabla A80- Características del tanque de almacenamiento | 162 |
| Tabla A81- Datos técnicos del compresor CA- PROSILENT 24 | 164 |
| Tabla A82- Propiedades del agua a 25°C | 166 |
| Tabla A83- Valores del coeficiente de pérdida de carga | 170 |
| Tabla A84- Características de los paneles LED seleccionado | 179 |
| Tabla P1- Costes de inmovilizado | 234 |
| Tabla P2- Factores directos | 235 |
| Tabla P3- Factores indirectos | 235 |
| Tabla P4- Presupuesto de ejecución por contrata | 236 |
| Tabla P5- Presupuesto de ejecución general | 236 |
| Tabla P6- Coste anual de materia prima | 237 |
| Tabla P7- Coste anual de consumo energético | 238 |
| Tabla P8- Coste anual de mano de obra | 239 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1- Contaminación en mares | 11 |
| Figura 2- Espectro UV | 15 |
| Figura 3- Protectores solares que la OCU ha solicitado su retirada | 16 |
| Figura 4- Diagrama conceptual de la transferencia de los productos derivados de los protectores solares | 18 |
| Figura 5- Cianobacteria | 20 |
| Figura 6- Ejemplo de micosporina | 20 |
| Figura 7- Imagen de <i>Anabaena sp.</i> continental tomada en el laboratorio | 24 |
| Figura 8- Imagen de <i>Anabaena sp.</i> marina tomada en el laboratorio | 24 |
| Figura 9- Espectrofotómetro empleado | 25 |
| Figura 10- Esfera integradora | 25 |
| Figura 11- Sustrato empleado | 25 |
| Figura 12- Espectros de radiación solar, de acción eritematosa y el producto de las dos, el riesgo de quemadura solar | 28 |
| Figura 13- Transmitancias de protectores solares comerciales | 29 |
| Figura 14- Biorreactores empleados | 30 |
| Figura 15- Medidor de radiación PAR | 31 |
| Figura 16- Filtrado de biomasa empleando una bomba a vacío | 32 |
| Figura 17- Filtros preparados para la pesada final | 32 |
| Figura 18- Recta de calibrado de <i>Anabaena sp.</i> marina | 33 |
| Figura 19- Recta de calibrado de <i>Anabaena sp.</i> continental | 34 |
| Figura 20- Variación de la absorbancia del cultivo con el tiempo | 34 |
| Figura 21- Variación de la concentración de biomasa con el tiempo | 34 |
| Figura 22- Cinética de crecimiento de <i>Anabaena sp.</i> marina en el reactor AS1 | 36 |
| Figura 23- Cinética de crecimiento de <i>Anabaena sp.</i> continental en el reactor AD1 | 36 |
| Figura 24- Montaje para el estresado celular | 38 |
| Figura 25- Refractómetro | 40 |
| Figura 26- Liofilizador empleado | 40 |
| Figura 27- Coloraciones diferentes en función del disolvente usado para la Extracción | 41 |
| Figura 28- Comparación de la cantidad de MAAs | 43 |
| Figura 29- Comparación de las transmitancias del protector solar CienSun con y sin biomasa | 44 |
| Figura 30- Esquema de reactores airlift | 54 |
| Figura 31- Diagrama de Gantt del funcionamiento de la planta (Parte 1) | 72 |
| Figura 32- Diagrama de Gantt del funcionamiento de la planta (Parte 2) | 72 |
| Figura 33- Diagrama de Gantt de la planificación del TFG (Parte 1) | 76 |
| Figura 34- Diagrama de Gantt de la planificación del TFG (Parte 2) | 76 |
| Figura 35- Diagrama de Gantt de la planificación de la fase experimental (Parte 1) | 76 |
| Figura 36- Diagrama de Gantt de la planificación de la fase experimental (Parte 2) | 76 |
| Figura A1- Ajuste del modelo de Verhulst para el biorreactor AS1 | 91 |
| Figura A2- Ajuste del modelo de Verhulst para el biorreactor AS2 | 92 |

| | |
|---|-----|
| Figura A3- Ajuste del modelo de Verhulst para el biorreactor AS3 | 93 |
| Figura A4- Ajuste del modelo de Verhulst para el biorreactor AD1 | 95 |
| Figura A5- Ajuste del modelo de Verhulst para el biorreactor AD2 | 96 |
| Figura A6- Ajuste del modelo de Verhulst para el biorreactor AD3 | 97 |
| Figura A7- Ejemplos de fotobiorreactores tipo airlift | 131 |
| Figura A8- Materiales transparentes empleados en industria | 144 |
| Figura A9- Espectro de emisión de las lámparas UVB usadas para el estresado celular | 146 |
| Figura A10- Dimensiones de la lámpara UVB utilizada a escala de planta piloto | 147 |
| Figura A11- - Dimensiones de la lámpara UVB utilizada a escala de laboratorio | 148 |
| Figura A12- Esquema de una centrífuga de disco | 154 |
| Figura A13- Centrífuga BTPX 305 | 155 |
| Figura A14- Liofilizador Lyolab 3.0 | 159 |
| Figura A15- Modelo del tanque de almacenamiento | 160 |
| Figura A16- Modelo de equipo de esterilización por radiación ultravioleta | 162 |
| Figura A17- Dosis aplicadas por el equipo esterilizador | 162 |
| Figura A18- Compresor CA-PROSILENT 24 | 164 |
| Figura A19- Diámetro de tubería seleccionado | 167 |
| Figura A20- Normativa por la que se rigen las tuberías seleccionadas | 167 |
| Figura A21- Diagrama de Moody | 169 |
| Figura A22- Modelo de bomba centrífuga seleccionada | 173 |
| Figura A23- Características de la bomba peristáltica del modelo I12 de la compañía Peribest | 174 |
| Figura A24- Características de la bomba peristáltica del modelo I17 de la compañía Peribest | 174 |
| Figura A25- Modelo de arcón congelador seleccionado | 178 |

DOCUMENTO I: MEMORIA

1. Resumen

En la actualidad, cada vez hay más conciencia social respecto al impacto que las actividades humanas tienen en el medio ambiente. Por este motivo, cada vez son más las personas que consumen productos ecológicos y con un origen biológico, tanto en alimentación como en cosmética. Se ha demostrado que los protectores solares son una fuente de contaminantes para los ecosistemas marinos costeros, por lo que se están buscando nuevas formulaciones que puedan reducir dicha contaminación.

En este trabajo se propone, en cuanto al cambio en la composición de los protectores solares, la incorporación de cianobacterias como componente principal, ya que algunas especies son muy buenas productoras de micosporinas, unos metabolitos secundarios con la capacidad de absorción de radiación UV, tanto A como B, que es como las microalgas consiguen protegerse de dicha radiación.

En el presente TFG se ha intentado estimular la producción de micosporinas por parte de cianobacterias del género *Anabaena sp.*, tanto con una especie marina como con una continental. Dicha estimulación se ha inducido mediante el estresado celular aplicando una dosis baja de radiación UVB, observándose que, para dosis de 25,92 kJ y 51,84 kJ aplicadas a lo largo de un tiempo de 72 horas, los resultados guardan similitud y no es posible afirmar qué dosis es más efectiva. Además, también se ha observado que la especie continental es mejor productora de dichos metabolitos, aumentando su producción en hasta un 50% cuando se trabaja con caudales bajos.

El estresado se ha realizado con el fin de elaborar un protector solar que contenga biomasa microalgal con alto contenido en micosporinas, habiendo diseñado previamente un método óptico *in vitro* de medición del Factor de Protección Solar (SPF), característica utilizada para la clasificación comercial de los protectores solares y relacionada con el grado de protección frente a la componente UV de la radiación solar que son capaces de ofrecer. El método empleado consiste en la medición de la transmitancia en el intervalo de 290-400 nm empleando un espectrofotómetro UV-Vis-NIR con esfera integradora, lo que permite calcular fotométricamente el SPF.

Para la validación del método propuesto se ha elaborado en el laboratorio un Protector Solar Estándar, de acuerdo a la *Food and Drug Administration* de los EE.UU. (FDA), resultando el SPF obtenido experimentalmente muy similar al aportado por la FDA.

Además, se ha realizado la determinación del SPF de diversos protectores solares disponibles comercialmente, entre ellos el modelo *Babaria Kids 50⁺*, del que la Organización de Consumidores y Usuarios, OCU, publicó recientemente que no cumplía con el SPF especificado, comprobándose experimentalmente la certeza de este hecho, puesto que se ha obtenido un valor del SPF de 32.

A la hora de la elaboración del protector solar a partir de microalgas del género *Anabaena sp.*, el SPF máximo logrado ha sido únicamente de 7,5. Por dicho motivo, se ha optado por añadir biomasa microalgal a uno de los protectores solares comerciales, observándose un aumento de su SPF superior al 50%, pasando de un valor inicial de 33 a uno de 55 tras añadir la biomasa.

Por otro lado, se ha diseñado el proceso de producción de la cianobacteria estudiada a escala de planta piloto, con el fin de obtener una producción de 25 kg/año. Para dicho cálculo, ha sido necesario obtener la cinética de crecimiento de *Anabaena sp.*, continental y marina, obteniéndose, respectivamente, una concentración máxima promedio de 471 y 973 mg/L y una productividad de 1,47 y 1,03 mg·L⁻¹·h⁻¹. Se obtienen valores de productividad bajos, puesto que en algunos estudios se han conseguido productividades superiores a 5 mg·L⁻¹·h⁻¹, provocados, probablemente, en este caso, por un efecto de fotoinhibición, el cual puede ser de interés de estudio para posteriores investigaciones.

Para el diseño del proceso de producción se operará en semicontinuo, y se han empleado reactores de columnas de tipo airlift, lo cual favorece el movimiento del cultivo en su interior de cara a su homogeneización y buena disposición a la luz y nutrientes de todo el volumen de cultivo, además de evitar una posible decantación. Los fotobiorreactores se situarán en el interior de una nave, con iluminación artificial, ya que la luz solar fotoinhibiría su crecimiento. Tras ello, pasarán a otros biorreactores donde se realizará su estresado por medio de radiación UV. Los procesos de downstream los constituyen una centrifugación y una liofilización, con objeto de obtener la biomasa seca y disponible para la elaboración del protector solar.

2- Abstract

Nowadays, social awareness is increasing regarding the environmental impact caused by human activity. For this reason, more and more people are consuming ecological products and with a biological origin, both in food and cosmetics. It has been proved that sunscreens are a source of contamination for coastal marine ecosystems, therefore new formulations which can reduce that contamination are being searched for.

Regarding the change in the composition of sunscreens, this project proposes adding cyanobacteria as a main component, because some species are really good producers of mycosporines, secondary metabolites capable of absorbing UV radiation, both A and B, that is how microalgae are able to protect themselves from that radiation.

In the present Final Degree Project, it has been tried made to stimulate mycosporine production by cyanobacteria of the genus *Anabaena sp.*, both with a marine and continental species. That stimulation has been carried out by cellular stress applying a low dose of UVB radiation, observing that, for 25.92 kJ and 51.84 kJ doses applied throughout 72 hours, the results are similar, and it is not possible to assert which dose is more effective. In addition, it was obtained higher quantity of MAAs with freshwater species than with marine one. The increase was up to 50% when working with low volumes.

The UV stress test has been done to develop a sunscreen that contains microalgal biomass with high content in mycosporines, designing previously an *in vitro* optical method to measure the Sun Protector Factor (SPF). SPF is used in the commercial classification of sun protectors and it is related to the degree of protection against the UV component of sun radiation that they are able to offer. The method employed consists in the measurement of the transmittance in the interval of 290-400 nm using an UV-Vis-NIR optical spectrometer with an integrating sphere, that allows the photometric calculation of the SPF.

For the validation of the proposed method a Standard Sun Protector has been developed in the laboratory, according to the Food and Drug Administration of the USA (FDA). The SPF obtained experimentally has been really similar to the one provided by the FDA.

Besides, the determination of the SPF of different sunscreens available commercially has been carried out, including *Babaria Kids 50⁺*, the one about which the Spanish Consumers and Users Organization, OCU, published recently that did not comply with the specified SPF, confirming experimentally the certainty of this fact, since a SPF value of 32 was obtained.

When elaborating the sunscreen with *Anabaena sp.* cyanobacteria, the maximum SPF achieved has been only 7.5. That is the reason why it has been chosen to add cyanobacteria biomass to one of the commercial sunscreens, observing an increase in its SPF higher than 50%, leading to a value of 55 from an initial one of 33 adding biomass.

Furthermore, the production process of the studied cyanobacteria has been designed at pilot-plant scale, in order to get a production of 25 kg/year. It has been necessary to obtain the growth kinetics of freshwater and marine *Anabaena sp.*, getting, respectively, an average maximum concentration of 471 and 973 mg/L and a productivity of 1.47 and 1.03 mg·L⁻¹·h⁻¹. Low productivity values have been obtained, because in some studies productivities are higher than 5 mg·L⁻¹·h⁻¹ have been achieved, caused, probably, in this case, by a photoinhibition effect, that could be of interest to study in future investigations.

In order to design the production process, it has been selected a semicontinuous operation mode and the use of airlifts reactors, which favors the culture movement inside for its homogenization and good disposition to light and nutrients of the whole culture volume, in addition to avoiding possible decantation. Photobioreactors will be located inside an industrial unit, with artificial illumination, because sunlight would photoinhibit its growth. After that, they will be moved to other bioreactors in which they will be stressed by UVB radiation. Downstream processes are constituted by a centrifugation and a lyophilization, in order to obtain the dry biomass to elaborate the sunscreen.

3. Objeto y alcance

El presente Trabajo de Fin de Grado de investigación e innovación, correspondiente a los grados de Biotecnología y de Ingeniería Química, persigue el objetivo principal de la elaboración de un protector solar que contenga biomasa microalgal como uno de sus componentes principales, en detrimento de compuestos químicos, con el fin de que sea más ecológico y sostenible para el medio ambiente.

De esta manera, se intenta satisfacer la demanda de la sociedad actual en lo referido a productos naturales y no contaminantes, en este caso para los ecosistemas marinos, que son los que se ven afectados principalmente por los compuestos químicos que forman parte de la composición de un protector solar.

El presente proyecto se centra en los ámbitos relacionados con la salud humana y con la preservación de los ecosistemas, ya que se propone la obtención de biomasa con el fin de que esta pase a formar parte de la composición de los protectores solares. Así, el ser humano puede protegerse de la radiación UV, puesto que es un producto dirigido hacia estos, y, a su vez, consiguiendo que se liberen menos productos químicos al mar.

Para alcanzar dicha meta ha sido necesario conseguir unos objetivos secundarios necesarios para la realización del proyecto; dichos objetivos son:

- ✓ Validación de un método óptico no invasivo para la determinación del factor de protección solar de cualquier crema gracias a mediciones de la transmitancia realizadas en el laboratorio.
- ✓ Estudiar la cinética de crecimiento de *Anabaena sp.*, que ha sido el género de microalgas propuesto para que sea el componente biológico del protector solar a elaborar.
- ✓ Optimizar la producción de micosporinas por parte de *Anabaena sp.*, que son unos metabolitos producidos por este organismo con la capacidad de absorber la radiación UV procedente del Sol.
- ✓ Diseñar del proceso de producción de la biomasa microalgal para obtener una productividad de 25 kg/año.

La productividad anual, citada anteriormente, junto con la cinética de crecimiento, obtenida en el laboratorio de manera experimental, constituyen los puntos de partida del diseño del proceso de producción.

Dicho proceso de producción además de fotobiorreactores, precisará de bombas, sistema de esterilización del medio de cultivo, una centrífuga, un dispositivo con radiación UV para inducir el estresado de la microalga y un equipo de secado de la biomasa, los cuales también serán especificados y descritos. También será necesario un espectrofotómetro que pueda incorporar una esfera integradora que nos permita determinar el factor de protección solar de la crema elaborada.

En este proyecto se desarrollan todos los pasos y etapas que habría que seguir si se deseara llevar a cabo el citado proceso de producción a la práctica. Además de la memoria, se incorporan los anexos, el presupuesto inicial, el pliego de condiciones y los planos de la planta.

4. Definiciones y abreviaturas

4.1- Definiciones

- **Cianobacterias:** antiguamente llamadas algas verdeazuladas, son un filo del dominio Bacteria que comprende las bacterias capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. Son los únicos procariontes que llevan a cabo ese tipo de fotosíntesis, por ello también se les llamó oxifotobacterias.
- **Coefficiente de extinción molar:** parámetro que define la capacidad de una sustancia de absorber la luz a una longitud de onda dada por su concentración molar.
- **Dosis mínima de eritema en la piel humana:** dosis mínima de radiación ultravioleta que produce un eritema perceptible en la zona expuesta a radiación de 16 a 24 horas después de la exposición a dicha radiación.
- **Eritema:** "enrojecimiento" de la piel debido a procesos inflamatorios o inmunológicos, que normalmente son el resultado de la acumulación de células del sistema inmunitario. Puede haber muchas causas: exposición al calor, picaduras de insectos, infecciones, alergias, la radiación no ionizante (luz solar, rayos UV) y la radiación ionizante (rayos X, radiación nuclear).
- **Espectrofotómetro:** según AENOR, es un instrumento que mide las propiedades de absorbancia (o transmisión) de un medio de ensayo en función de la longitud de onda.
- **Filtros UV:** compuestos químicos orgánicos que absorben la luz UV y sustancias inorgánicas que reflejan, dispersan y absorben luz UV.
- **Producto de protección solar:** preparación (como por ejemplo crema, aceite, gel, spray...) que se pone en contacto con la piel humana, con el único fin de protegerla de la radiación UV a través de su absorción, reflexión y dispersión; de acuerdo a la European Comission.
- **Transmitancia:** magnitud que expresa la cantidad de energía que atraviesa un cuerpo en la unidad de tiempo.
- **Transmitancia difusa:** parte de la radiación que atraviesa un cuerpo variando su dirección.

4.2-Abreviaturas

- **EPs:** contaminantes emergentes (*emerging pollutants*)
- **FDA:** Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (*Food and Drug Administration*).
- **MAAs:** aminoácidos tipo micospolina, comúnmente llamados micospolinas solamente (*Mycosporyne-like amino acids*).
- **LED:** diodo emisor de luz (*Light Emitting Diode*)
- **MED:** dosis mínima de eritema en la piel humana.
- **OCU:** Organización de Consumidores y Usuarios
- **PAR:** radiación fotosintéticamente activa (*photosynthetically active radiation*).
- **ROS:** especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*).
- **RPM:** revoluciones por minuto.
- **SPF:** factor de protección solar (*sun protection factor*).
- **UV:** ultravioleta.
- **UVA:** ultravioleta A.
- **UVB:** ultravioleta B.
- **WWTP:** plantas de tratamiento de aguas residuales (*Wastewater Treatment Plants*).

5. Antecedentes

5.1- ¿Productos naturales o químicos?

En la actualidad, hay una fuerte tendencia a darle mucho más valor a los productos ecológicos y biológicos que a los que contienen compuestos químicos. Esta tendencia muchas veces surge desde el desconocimiento, pero sí es cierto que otras muchas veces se ve apoyada por estudios científicos. De hecho, cada vez se están encontrando más productos químicos que no se consideraba que eran perjudiciales para los seres humanos, pero con nuevas investigaciones y estudios se está demostrando que sí lo son. Un ejemplo es la investigación realizada por científicos de la Universidad de Granada, el Hospital Clínico San Cecilio de Granada y el CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP): ha detectado la presencia de dos productos tóxicos, bisfenol A y parabenos, en tejidos textiles que pueden alterar la actividad hormonal normal (Freire et al., 2019).

Por otro lado, en lo que al medio ambiente se refiere, también hay cada vez mucha más conciencia social de la necesidad de la promoción de políticas conservacionistas. Diariamente vemos noticias en los telediarios y periódicos sobre la contaminación de aire, con el caso, por ejemplo, de Madrid Central; o la contaminación del agua, como es la derivada del vertido y acumulación en mares y océanos de plásticos y microplásticos. Es importante tener en cuenta que la contaminación marina no solo puede perjudicar a la fauna de dichos ecosistemas, sino que los humanos tenemos la posibilidad de introducir en nuestro cuerpo, mediante la ingesta de dichos organismos, los contaminantes que estos, en su día, ingirieron.

Por estos motivos, cada vez es mayor el número de personas que procuran consumir más productos de certificación “bio”, tanto en alimentación, como en cosmética. Este Trabajo de Fin de Grado está relacionado con este último campo de aplicación, ya que se plantea el diseño y elaboración de un protector solar a partir de microalgas, en detrimento de compuestos químicos (sintéticos), así como sería su proceso de producción a escala de planta piloto.



Figura 1- Contaminación en mares

5.2- Necesidad de protección

A lo largo de la historia, el Sol ha sido para multitud de civilizaciones y en distintas épocas un objeto de adoración y exploración. Sin embargo, los humanos siempre han sentido la necesidad de proteger su piel del sol. Ya los egipcios, fueron los primeros en usar una especie de protector solar realizado a partir de aceite de oliva, al igual que sucedió en la Antigua Grecia y Roma (Sánchez-Quiles & Tovar-Sánchez, 2015).

Los protectores solares se definen como “cualquier producto cosmético que contiene filtros UV en su formulación con el fin de proteger la piel de la luz UV perjudicial procedente del Sol, evitando, o minimizando, el daño que dicha radiación puede causar en la salud humana” (Salvador & Chisvert, 2005).

Por ello, los componentes principales de los protectores solares son los filtros UV, considerándose filtro UV a “toda aquella sustancia con un rango de absorción de la luz en el rango de la radiación ultravioleta (UVB y UVA, esto es de 280 a 315 y de 315 a 400 nm, respectivamente), pero sin absorción en el rango del visible (Díaz-Cruz & Barceló, 2009).

A pesar de que, como se ha comentado, el ser humano siempre ha intentado protegerse del sol, no fue hasta finales del siglo XIX cuando las primeras investigaciones científicas en relación con los protectores solares se llevaron a cabo. En el periodo comprendido entre 1887 y 1934 se identificaron varios compuestos que pueden actuar como filtros de radiación UV, aunque hasta 1928 el primer protector solar no estuvo comercialmente disponible. De hecho, fue en esos años cuando las principales compañías cosméticas internacionales nacieron, tales como L'Oréal o Delial, y cuando los protectores llegaron a ser ampliamente utilizados por la población mundial (Roelands, 2008; Urbach, 2001).

La breve exposición, entre 5 y 10 min, a la radiación UV tiene efectos terapéuticos, como el aumento de la producción de la vitamina D, la cual aumenta la absorción de calcio, previniendo enfermedades como la osteoporosis. Sin embargo, largas exposiciones pueden causar daños severos a la piel como eritemas o melanomas (Holick, 2004).

Las radiaciones UV más energéticas son las causantes de daños celulares desencadenando efectos negativos en el ADN y en proteínas de manera directa, y otros efectos indirectos tales como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por su nombre en inglés: reactive oxygen species) (Sinha R.P. et al., 2008), causantes del estrés oxidativo, lo que origina daños celulares.

5.3- Composición de los protectores solares

Los protectores solares están compuestos por productos orgánicos (para-aminobenzoatos, cinnamatos, benzofenonas, dibencilometanos, etc), los cuales tienen la capacidad de absorber la radiación UV procedente del Sol; y productos inorgánicos, siendo los dos únicos permitidos el TiO_2 y el ZnO , que son empleados en forma de nanopartículas, con un tamaño inferior a los 100nm (Osterwalder et al., 2014). Estos compuestos inorgánicos, principalmente, reflejan y dispersan, aunque también pueden absorber, en menor medida, la radiación UV procedente del Sol, protegiendo de esta manera la piel. Debido a sus propiedades fotocatalíticas, las partículas de TiO_2 son recubiertas con óxido de aluminio o sílica para prevenir la formación de ROS al entrar en contacto con el agua (Jansen et al., 2013).

Además de estos compuestos principales, los protectores solares contienen otros productos, tales como conservantes (principalmente derivados de los parabenos) (Peck, 2006), colorantes (como sulfato de amonio, óxidos de zinc, metales...) (Weisz et al., 2007), agentes coagulantes (acrilamidas en su mayoría) (Quartier et al., 2006), tensoactivos, agentes quelatos, reguladores de viscosidad, agentes aromáticos, etc. (Tonning et al., 2009).

La formulación y la concentración de los ingredientes en los cosméticos, grupo en el que se incluyen los protectores solares, es muy variada y está regulada por agencias locales o internacionales, como la European Union Cosmetics y la United States Food and Drug Administration, con el fin de encontrar un equilibrio entre una protección UV y la disminución de los efectos colaterales sobre la piel de los humanos (Giokas et al., 2007). Al estar regulada la composición de los protectores por diferentes organismos internacionales, los límites de concentración que pueden ser usados en la formulación pueden variar de una región del mundo a otra.

5.4- Medición del factor de protección solar

5.4.1- Cálculo matemático del SPF

Los protectores solares se clasifican comercialmente de acuerdo al denominado factor de protección solar (SPF por sus siglas en inglés: Sun Protection Factor), el cual se define como:

$$SPF = \frac{med_{with\ sunscreen}}{med_{without\ sunscreen}} \quad (1)$$

Donde *med* es la mínima dosis de radiación solar para inducir la formación de eritema. Por tanto, el SPF es una relación entre las energías requeridas para inducir un eritema con y sin protector solar en la piel de humana, usando radiación UV de una fuente artificial de intensidad constante.

Esta definición tiene el inconveniente de que no siempre la piel responde de igual manera frente a la radiación solar, además de que se necesitarían seres humanos para ello. Por este motivo, se ha planteado diseñar una manera de poder medir el protector solar in vitro, alternativo a ese método in vivo.

La magnitud que se relaciona más directamente con la medida de qué cantidad de radiación UV es capaz de absorber un compuesto es su absorbancia a esa longitud de onda, que está relacionada con la transmitancia de la siguiente manera:

$$A = -\log(T) \quad (2)$$

A partir de la transmitancia, puede definirse el SPF, con el fin de que sea fácilmente cuantificable, mediante la expresión:

$$SPF = \frac{\int_{290}^{400} E(\lambda)S(\lambda)d\lambda}{\int_{290}^{400} E(\lambda)S(\lambda)T(\lambda)d\lambda} \quad (3)$$

En la que $E(\lambda)$ es el espectro de acción eritematosa, $S(\lambda)$ es el espectro de irradiancia solar y $T(\lambda)$ es el espectro de la transmitancia. Los límites de integración corresponden a la franja del espectro correspondiente al ultravioleta A (320-400 nm) y al B (290-320 nm) (Diffey et al., 1989; Diffey et al., 2000; Osterwalder et al., 2009; Schmalwieser et al., 2012; Moyal et al., 2013).

Históricamente, los primeros estudios en los que se establecieron las bases del SPF o índice de protección (IP) comenzaron en la década de los 30 y fueron publicados en los 40 por H. Blum et al. y en los 50 por R. Schulze. Estos estudios y otros trabajos sobre estandarización condujeron, por un lado, a la definición tradicional del concepto de dosis mínima de eritema y del SPF, y, por el otro, al primer método de determinación del SPF admitido por la *Food and Drug Administration* (FDA) de los EE.UU. en 1978, seguido, en 1984, por la norma DIN67501 de Alemania la cual se empezó a utilizar en toda Europa (Fuente: European Commission).

El eritema inducido por la radiación UV del Sol es producido principalmente por longitudes de onda comprendidas entre los 295 y 320 nm, con un máximo de efectividad en torno a los 308 nm. Por esta razón, algunos intentos previos de estandarizar la radiación UV se centraban en las longitudes de onda del UVB. Sin embargo, cuando un producto de protección solar es testado, la contribución a la formación de eritema por las longitudes de onda correspondientes al UVA puede llegar a ser muy importante. Por ello, es necesario incluir las longitudes de onda pertenecientes al UVA y al UVB cuando se intenta estandarizar la radiación solar, como se ha comprobado con la fórmula que define matemáticamente el SPF.

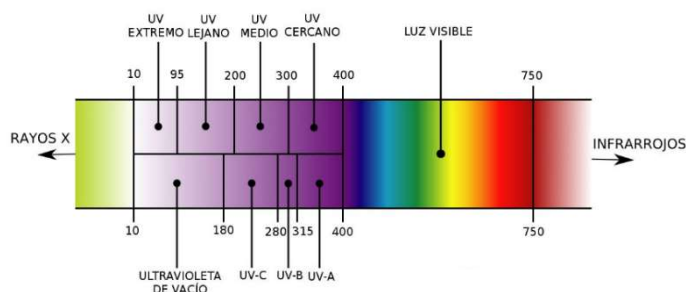


Figura 2- Espectro UV

5.4.2- Importancia de la medición del SPF

La correcta determinación del SPF por parte de las empresas productoras de protectores es un factor clave para su venta y distribución, puesto que, si este no fuera correcto, se estaría vendiendo un producto con unas características diferentes de las anunciadas, lo cual, además de suponer un fraude al consumidor, podría tener consecuencias sobre su salud.

De hecho, hace poco más de un mes, concretamente el pasado 30 de mayo, la Organización de Consumidores y Usuarios (OCU), lanzó una noticia, recogida en prensa, en la que afirmaba que había testado diferentes protectores solares del mercado, determinando su SPF y que dos de ellos no cumplían con lo establecido.

Estos dos protectores son *ISDIN Fotoprotector Pediatrics Transparent Spray SPF 50+*, el cual constituye el caso más grave, pues según los resultados solo ofrece una protección media y debería etiquetarse como SPF 15; y *Babaria Infantil Spray Protector SPF 50+*, el cual tampoco ofrece la protección solar anunciada, y su etiqueta debería indicar SPF 30.

Por ese motivo y en vista de los resultados obtenidos, la OCU ha solicitado a la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) que realice las comprobaciones necesarias y retire del mercado estos dos productos, por el riesgo grave que su uso puede suponer para la salud de los consumidores, niños principalmente en este caso en concreto (Fuente: OCU).



Figura 3- Protectores solares que la OCU ha solicitado su retirada

5.5- Efectos de los protectores solares en los ecosistemas marinos

La contaminación del agua por los contaminantes emergentes (emerging pollutants, EPs) ha ganado interés científico desde la década de los 90. Sin embargo, la presencia de EPs en los diferentes productos no se controla regularmente debido a la falta de requerimientos controladores y altos costes analíticos (Cabeza et al., 2012). Estos compuestos están definidos por la Agencia de Protección Medio Ambiental de los EE. UU. (US-EPA) como nuevos compuestos sin un estatus regulatorio y con un impacto medioambiental y en la salud humana negativo.

Los EPs se encuentran en un amplio rango de productos, tales como los destinados al cuidado personal, los productos farmacéuticos, nanopartículas, antibióticos, compuestos industriales, etc. (Bo et al., 2016; Magi & Di Carro, 2016).

Los productos de cuidado personal junto con los productos farmacéuticos son las dos mayores fuentes de EPs, contaminando tanto el suelo como los ecosistemas marinos. (Blair et al., 2013; Corada-Fernández et al., 2015). Los productos de cuidado personal incluyen un gran número de químicos sintéticos incorporados en productos de uso diario como, por ejemplo, jabones, pasta de dientes, colonias y protectores solares (Kolpin et al., 2002; Brausch & Rand, 2011).

Recientemente, distintas investigaciones se han centrado en los efectos del protector solar en el medio ambiente, especialmente el marino; ya que, al ser la mayoría de los componentes de los protectores solares hidrosolubles, una parte de estos componentes pasan al agua cuando nos bañamos, en mares, lagos o ríos, después de su aplicación.

Un estudio de 2013, realizado por el Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados, expuso que el intenso uso de los protectores solares es una fuente significativa de contaminantes químicos orgánicos e inorgánicos que pueden tener consecuencias ecológicas. En concreto, señalan que son ciertos componentes los que pueden alterar los ecosistemas costeros, principalmente aditivos, como los utilizados para dar color, aroma y textura (Sánchez-Quiles et al., 2014).

Uno de los profesionales químicos que trabajó en la investigación, Antonio Tovar, mencionó que “aunque existen compuestos orgánicos insolubles, tipo aceite, muchos otros son solubles en agua, y las marcas emplean unos, otros o ambos, y este factor, de entrada, es muy importante porque los compuestos que se disuelven son más fácilmente bioasimilables, es decir, capaces de acumularse a través de la cadena trófica”. Por este motivo, la vida marina se ve perjudicada por los componentes de los protectores solares. Antonio Tovar también sostuvo que “los experimentos demuestran que algunos de estos productos tienen efectos tóxicos sobre el fitoplancton marino, los crustáceos, las algas y los peces”. (Fuente: Periódico El Mundo).

Por otro lado, y apoyando lo comentado anteriormente, estudios previos llevados a cabo en lagos (como el de Zúrich y el de Hüttnersee en Suiza) sugieren que los filtros UV deben ser eliminados del agua, ya que, debido a su estabilidad y persistencia frente a la biodegradación, tienden a ser incorporados por organismos, y por ello, en las diferentes cadenas tróficas. (Santos et al., 2012; Díaz-Cruz et al., 2009).

Los filtros UV pueden alcanzar el ambiente marino de dos maneras principalmente:

- Directamente, como consecuencia de las actividades recreativas llevadas a cabo en el agua.
- Indirectamente, por las plantas de tratamiento de aguas residuales o WWTP (Wastewater Treatment Plants) (Díaz-Cruz & Barceló, 2009).

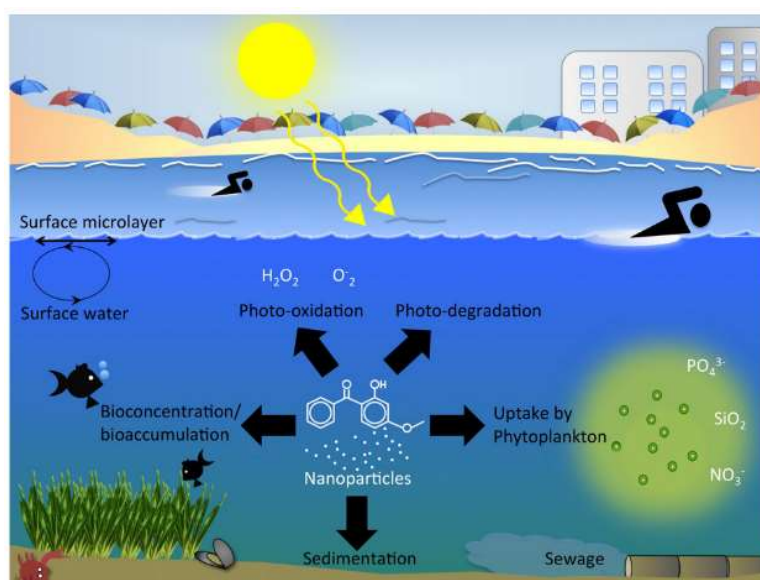


Figura 3- Diagrama conceptual de la transferencia de los productos derivados de los protectores solares

Varios estudios han indicado que hay una relación directamente proporcional entre la afluencia de personas que van a la playa y la cantidad de componentes de protectores solares que se liberan en el agua del mar, lagos y ríos (Tovar-Sánchez et al., 2013).

Además, es importante tener en cuenta que, aunque es lógico que sobre la piel los filtros UV deben ser fotoestables frente a la radiación solar, en medio acuoso, como el agua del mar, pueden verse sometidos a cambios y adquirir una forma indeseable, con la que se pueden ver comprometidas sus propiedades relacionadas con la absorción del UV (Santos et al., 2012).

Por otro lado, Tovar-Sánchez et al. (2013) han demostrado, con experimentos de laboratorio y medidas de campo, que los protectores solares pueden ser una fuente de nutrientes (nitrato, nitrito, fosfato, silicato y amonio) en los ecosistemas costeros marinos, aunque la significancia ecológica de este hecho todavía no ha sido evaluada.

5.6- Elaboración de protectores solares biológicos

5.6.1- Cianobacterias

Las cianobacterias son un grupo de procariotas gram-negativos con capacidad fotosintética que pueden encontrarse en ambientes terrestres y marinos, incluyendo algunos hábitats extremos, como lugares con bajas o muy altas temperaturas, medios con pH extremos y zonas con altas concentraciones de sal (Wada et al., 2013).

Además, las cianobacterias están expuestas simultáneamente a radiación visible y UV en sus hábitats durante la absorción de la energía solar para la fotosíntesis, sin resultarles esta perjudicial. En concreto, los ecosistemas a altas altitudes son considerados unos de los hábitats sujetos a radiaciones más fuertes. Por ejemplo, se ha estudiado que, en los Alpes, la radiación UV aumenta un 19% por cada 1000m de altitud (Blumthaler et al., 1992). A pesar de esto, varios estudios han revelado la existencia de varias especies de cianobacterias en lagos situados a altitudes comprendidas entre los 2400 y los 6000 metros de altitud (Sonntag et al., 2009; Singh et al., 2014).

Las cianobacterias son uno de los grupos de procariotas fotosintéticos más extendidos, con una distribución en ecosistemas muy variados en todo el mundo, como se ha comentado anteriormente. Este grupo de organismos tiene un gran impacto en los ecosistemas naturales, pudiendo tener tanto efectos beneficiosos como perjudiciales en los ciclos geoquímicos y en la salud humana. Por un lado, pueden realizar tanto la fotosíntesis como la fijación del nitrógeno; y, por el otro, pueden producir toxinas letales para otros seres vivos. En lo referido a la salud humana, hay géneros de cianobacterias, como *Spirulina sp.*, que se pueden consumir debido a su alto contenido de caroteno, que es utilizado como antioxidante y se transforma en vitamina A al entrar en el organismo.

Además de su importancia ecológica, las cianobacterias son también reconocidas como una fuente potencial de metabolitos secundarios con interés farmacéutico. Sin embargo, un gran problema a la hora de la explotación y mejora genética de las cianobacterias, es la posible confusión a la hora de diferenciar las distintas cepas cuando se trabaja con ellas.



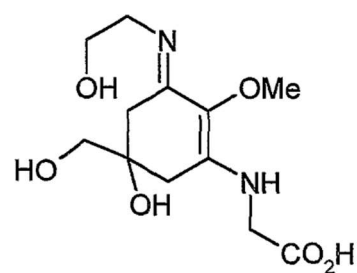
Figura 4- *Cianobacteria*

5.6.2- Utilidad de las cianobacterias

Para evitar los efectos tóxicos de la radiación UV, se ha demostrado que las cianobacterias son capaces de sintetizar unos compuestos que las protegen frente a la citada radiación. Dentro de estos compuestos, destacan de una manera notable los aminoácidos tipo micosporina (Mycosporine-like amino acids, MAAs), que actúan como un protector solar natural en las cianobacterias.

5.6.3- Concepto y funciones de las micosporinas

Los aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) constituyen un importante grupo de productos naturales. Las MAAs son un grupo de metabolitos secundarios consistentes en un aminoácido unido a un cromóforo, que absorbe bajas longitudes de onda, perteneciente al rango del UV, y les proporciona el color a estas moléculas. Las MAAs tienen bajo peso molecular (inferior a 40 kD) y son solubles en agua, puesto que portan un ciclohexano o ciclohexanona que presenta grupos amino y alcohol (Nakamura et al., 1982).



Asterine 330

Figura 5- Ejemplo de micosporina

Las micosporinas se han identificado en el interior de las células, tanto en organismos marinos como en otros que habitan en agua dulce, e incluso en algunos organismos terrestres (Bandaranayake, 1998; Gröniger et al., 2000; Shick & Dunlap, 2002; Rezanka et al., 2004). Mayoritariamente, se han identificado en microalgas verdes. Estos aminoácidos tienen como función principal proteger al organismo frente a la radiación UV, ya que presentan un máximo de absorción entre 310-362 nm con grandes coeficientes de extinción molar (Nakamura et al., 1982), siendo uno de los compuestos que absorben el UVB de forma más efectiva. Por ello, su función más importante es la fotoprotección.

Las MAAs ofrecen un gran potencial para el desarrollo de nuevos protectores solares frente a la radiación por UV. Muchos estudios han demostrado que las MAAs pueden proteger a las cianobacterias debido a su capacidad de absorción de la radiación UV, la cual es dañina para el microorganismo (Ehling-Schulz et al., 1999).

Además, aparte de la propiedad ya citada, existen evidencias de que la acumulación de MAAs tiene otras funciones biológicas, tales como antioxidantes, antiinflamatorias, eliminadoras de sustancias tóxicas como las ROS y como osmoprotectoras. (Oren et al., 2007). Estas características las hacen ser unas prometedoras candidatas como protectores solares naturales con aplicaciones cosméticas, biomédicas, farmacéuticas y biotecnológicas.

5.6.4- Descubrimiento de las micosporinas

Las MAAS son un grupo de metabolitos nitrogenados solubles en agua, que inicialmente estaban asociadas con la esporulación en hongos terrestres estimulada por una baja luz. En 1965, Leach detectó la presencia de un compuesto absorbedor de radiación UV (máximo de longitud de onda de 310 nm) en los hongos cuando dicho tipo de esporulación era inducido (Leach et al., 1965).

Unos años más tarde, en 1969, Shibata encontró otros compuestos absorbedores de UV en extractos acuosos de corales y cianobacterias (Shibata, 1969). Estos compuestos tenían un máximo de absorción aproximadamente a 320 nm y fueron identificados como miembros de la misma familia que el producto descubierto por Leach. Dichos compuestos fueron nombrados como micosporinas. (Dunlap et al., 1986).

Se ha comprobado que muchas algas son capaces de sintetizar MAAs; en cambio, otras las adquieren gracias a procesos simbióticos o asociaciones con bacterias (Shick et al., 1992; Stochaj et al., 1994; Carroll & Shick, 1996). Desde que las MAAs fueron encontradas en los hongos, se han realizado muchos estudios basados en ellas, tanto en micro como en macroorganismos, especialmente en algas, corales, dinoflagelados y cianobacterias (Gao Q. et al., 2011). Aunque las MAAs puedan ser detectadas en animales, se cree que nos las producen directamente, sino que las incorporan gracias a la cadena alimentaria o por simbiosis con otros microorganismos.

5.6.5- Micosporinas como componentes de protectores solares

La producción de MAAs puede inducirse exponiendo el cultivo a una dosis moderada de radiación UV (Karsten et al., 2007; Xiong et al., 1999). De hecho, se ha estudiado la aplicación de las MAAs sobre la piel de organismos superiores para protegerlos de la radiación UV, consiguiéndose resultados satisfactorios (de la Coba et al., 2009).

En 2006, Schmid et al., estudiaron las MAAs con el fin de caracterizarlas con propósitos comerciales, para venderlas incorporadas a protectores solares. Otro factor a considerar de las micosporinas como componente de cremas para la piel, es que se ha demostrado que también pueden actuar como antioxidantes, como se ha citado anteriormente (Dunlap & Yamamoto, 1995).

Los fotoprotectores son principalmente absorbedores de la radiación UVA y UVB, las cuales pueden pasar a través de la atmósfera y alcanzar la superficie terrestre. Las MAAs están capacitadas para absorber dosis letales de estas radiaciones muy energéticas. Hay evidencias de que evitan que 3 de cada 10 fotones alcancen sus dianas citoplasmáticas en la cianobacterias (García-Pichel et al., 1993). Estos compuestos, además de absorber la radiación UV, disipan el exceso de energía en forma de radiación no dañina.

En relación a su uso como protector solar, se ha comprobado que el comportamiento de las MAAs frente a la radiación UV, es mejor que el de los compuestos químicos, ya que estos alteran sus estados y generan ROS; y, en cambio, las MAAs absorben la radiación UV, pero disipan el exceso de energía en forma de calor sin generar estos reactivos secundarios (Baker et al, 2017). Además, muchos protectores solares basados en compuestos orgánicos e inorgánicos han mostrado ya efectos adversos en el medio

ambiente, por lo que las MAAs son una nueva oportunidad en la búsqueda de una alternativa natural a los protectores solares. A lo que habría que añadir sus propiedades antioxidantes, como se ha citado anteriormente (Schlumpf et al., 2004).

5.6.6- Aumento inducido en la producción de micosporinas

Se ha demostrado que la concentración intracelular de micosporinas se ve afectada por varios factores medioambientales en los organismos acumuladores de MAAS, incluyendo cianobacterias. Dichos factores son la radiación UV y otros factores de estrés abiótico, como la temperatura y la salinidad. Sin embargo, los mecanismos moleculares que rigen la regulación de la biosíntesis de micosporinas en cianobacterias no se conocen todavía.

La biosíntesis de las micosporinas se ve mejorada por la exposición a la radiación UV. En cianobacterias, la producción se aumenta significativamente por radiación fotosintéticamente activa (PAR, photosynthetically active radiation), UVA y radiación UVB. La inducción más efectiva por radiación UVB se encontró en *A. variabilis*, *A. doliolum*, *Anabaena sp.*, *N. commune* y *Arthrospira sp.* (Singh et al., 2008).

Sinha et al., en 2003, demostraron que la radiación UVB mejoraba la síntesis de una de las MAAs principales llamada *shinorina*, mientras que PAR y UVA no la inducían de manera significativa en *Anabaena sp.*

Además de la radiación, se ha demostrado que hay otros métodos que afectan a la biosíntesis de MAAs, como el estrés salino (con NaCl), de manera independiente a si hay exposición a la radiación UV o no.

5.6.7- *Anabaena sp.*

Anabaena sp. es un importante género de cianobacteria que se identifica principalmente en base a sus características morfológicas; tales como forma y tamaño de los tricomas, sus células y tamaño, la localización de sus heterocistos y anicetos y por sus planos de división (Rippka et al., 1979). Presentan reproducción asexual.

De acuerdo a sus descripciones morfológicas y ecológicas realizadas por Desikachary (1959), el género *Anabaena* sp. se identifica en base a “la presencia de tricomas uniformes, ausencia de vaina, o presencia de vainas difluentes de forma libre o un tallo mucilaginoso, heterocistos generalmente intercalados, y presencia de una sola o serie de esporas cerca del heterocisto o entre dos heterocistos”. Generalmente miden de 2 a 10 micrómetros, aunque algunas especies pueden llegar a medir hasta 20 micrómetros. Hay especies de vida libre y la mayoría son filamentosas.



Figura 7- Imagen de *Anabaena* sp. continental tomada en el laboratorio



Figura 6- Imagen de *Anababaeana* sp. marina tomada en el laboratorio

Desde el punto de vista taxonómico, hay una controversia debido a la posible ausencia de heterocistos o anicetos debido a los cambios del fenotipo bajo diferentes condiciones ambientales, por lo que se requiere un acercamiento más fiable a la taxonomía de las cianobacterias de manera que también tenga en cuenta sus atributos fisiológicos, bioquímicos y moleculares.

La combinación de marcadores moleculares, como el ARN ribosómico, morfológicos o ecológicos se ha convertido en el método de oro para la taxonomía de cianobacterias (Fox et al, 1992; Boyer et al., 2001; Malone et al., 2015). Se ha comentado que las cianobacterias con heterocistos como *Anabaena* sp. son difíciles de caracterizar debido a que su morfología es similar a la de otros géneros. Por este motivo, *Anabaena* sp. ha sido encuadrada por distintos investigadores en varios filos (Komárek, 2013).

Algunas especies generan blooms o floraciones, otras tienen capacidad de producir bioluminiscencia y ciertas especies pueden llegar a ser tóxicas.

6. Desarrollo experimental

6.1- Medición del Factor de Protección Solar

6.1.1- Equipos y materiales utilizados

Esta medida se ha realizado siguiendo la norma UNE-EN ISO 24443, que tiene por título *Determinación in vitro de la fotoprotección UVA*. Para las mediciones del Factor de Protección Solar de los diferentes protectores, se ha empleado un espectrofotómetro modelo Cary 5000 UV-Vis-NIR de la compañía Agilent Technologies.



Figura 9- Espectrofotómetro empleado



Figura 10- Esfera integradora

Se ha medido, debido a lo citado en el apartado de antecedentes, en el intervalo del espectro que abarca desde los 290 a los 400 nm de longitud de onda, con un incremento de 1 nanómetro. El espectrofotómetro utilizado incluye una esfera integradora modelo Internal DRA 2500 para realizar la medición de la transmitancia difusa, y, en este caso, se ha registrado la radiación directa y la difusa. Este accesorio es ideal para la medida de la luz transmitida por muestras que presentan una alta difusión de la luz.

Como sustrato para las mediciones se ha utilizado una cinta adhesiva porosa de la marca Transpore 3M, sobre la que se distribuye el protector por toda la superficie. En este proceso de medida, se realiza un blanco aplicando unos microlitros de glicerina sobre la parte rugosa del sustrato, siendo todas las medidas posteriores referenciadas a este blanco.



Figura 11- Sustrato empleado

6.1.2- Aplicación del producto para la medición

A continuación, se procede a realizar las mediciones del protector solar, el cual se aplica sobre la parte rugosa de un nuevo sustrato no tratado. Aunque no hay establecida una manera correcta ni una cantidad o dosis de protector solar que nos tengamos que aplicar sobre la piel, está estimado que la cantidad promedio de aplicación se encuentra entre 1 y 2 mg/cm², lo que corresponde a un espesor aproximado de entre 10 y 20 micrómetros (Binks B. et al., 2016), por lo que en todas las mediciones nos hemos asegurado que la masa de protector solar colocada sobre el sustrato se encontrara en dicho intervalo, para lo cual se ha empleado una balanza de precisión.

Una vez depositado el producto sobre la cara rugosa del sustrato, se extiende de inmediato por toda la superficie mediante ligeros toques con la yema del dedo, realizando movimientos circulares y ejerciendo una presión mínima durante un tiempo no superior a 30 segundos. Tras ello, se continúa extendiendo la muestra utilizando alternativamente trazos verticales y horizontales, empleando, para ello, un portaobjetos de vidrio, con un leve incremento de la presión, durante un tiempo de 20 o 30 segundos.

Una vez extendida la crema, la muestra ha de dejarse secar durante 30 minutos, como mínimo, en oscuridad y a la misma temperatura a la que tendrá en las condiciones a las que se expondrá a la radiación UV. Dicha temperatura, en nuestro caso, era la temperatura ambiente, aproximadamente 25°C. De esta manera, se evaporarán todos los componentes volátiles que, por dicho motivo, no protegen frente a la radiación.

6.1.3- Validación del método

Para validar nuestro método de medición del SPF, se elaboró en el laboratorio un Protector Solar Standard de acuerdo a la FDA (Food and Drug Administration, organismo oficial del Gobierno de los Estados Unidos).

La composición de dicho Protector Solar Standard de homosalato es la siguiente:

| Compuestos | Porcentaje en masa |
|----------------------|---------------------------|
| Preparación A | |
| Lanolina | 5.00 |
| Homosalato | 8.00 |
| Petrolatum Blanco | 2.50 |
| Ácido Esteárico | 4.00 |
| Propilparabeno | 0.05 |

| Preparación B | |
|------------------------|-------|
| Metilparabeno | 0.10 |
| Edetato de disodio | 0.05 |
| Propilenglicol | 5.00 |
| Trietanolamina | 1.00 |
| Agua purificada U.S. P | 74.30 |

Tabla 1- Composición del protector estándar de homosalato

El procedimiento experimental seguido es el especificado por la FDA en su página oficial. Dicho protector solar estándar de homosalato, al ser este el compuesto mayoritario en su composición, se elabora a partir de las dos preparaciones (con sus correspondientes composiciones) citadas anteriormente.

Una vez se han elaborado las dos preparaciones, se calientan por separado hasta los 77 y 82°C, respectivamente, con agitación constante hasta que todos los componentes de las dos preparaciones se han solubilizado, con ayuda de un agitador magnético. Tras ello, la preparación A se añade lentamente a la preparación B, manteniendo la agitación. Una vez ha sido añadida, se deja enfriar la preparación resultante hasta temperatura ambiente, todavía agitándose. Debido a la alta temperatura necesaria para la elaboración, parte del agua se ha evaporado, por lo que se ha de añadir agua de nuevo hasta volver a tener un 74,3% de agua en nuestro protector estándar.

Por otro lado, se ha de preparar un solvente de ensayo, el cual consiste en un 1% de ácido acético glacial en etanol puro (dicho porcentaje es relación de volúmenes). Tras ello, se elabora una solución al 1% de protector solar estándar de homosalato. Para ello, es necesario pesar 1 gramo del protector solar estándar y diluirlo en 50 mL del solvente de ensayo e introducir dicha dilución en un matraz aforado de 100 mL. Dicha solución se ha de calentar en un baño de vapor para su correcta homogeneización. A continuación, se deja enfriar la solución hasta temperatura ambiente. Una vez enfriada, se diluye la solución hasta el volumen del matraz, empleando el solvente elaborado anteriormente para obtener una solución final al 1%.

Ya elaborada la solución al 1%, se filtra usando un filtro de papel número 1. Se descartan los primeros 10 o 15 mL del filtrado y se recolectaban los 20 siguientes, de los cuales se añade únicamente 1 a otro matraz aforado de 50 mL y se diluye empleando, de nuevo, el solvente de ensayo elaborado previamente. Esta solución final es el test de ensayo.

El SPF del protector solar estándar propuesto por la FDA ha de tener un valor medio de 4,47 con una desviación estándar de 1,279 y una concentración de homosalato del 8%. Dicho organismo considera que para que la determinación del SPF de cualquier producto sea válido, el SPF del protector solar estándar elaborado siguiendo el procedimiento citado medido en el laboratorio, debe encontrarse dentro del rango esperado del SPF, es decir, $4,47 \pm 1,279$.

Al realizar la medición en el laboratorio obtuvimos un valor medio de 3,762 con una desviación estándar de 0,165. Al encontrarse dentro del intervalo citado anteriormente, consideramos que nuestro método de medición es válido. La concentración de homosalato la hallamos de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{Concentración de homosalato} = 50 * 100 * 172 * Abs_{306} \quad (4)$$

La concentración de homosalato hallada es del 8,2%. Luego la solución fue preparada también de una manera correcta.

El cálculo del SPF se ha realizado midiendo la transmitancia de acuerdo a lo establecido en los apartados 6.1.1 y 6.1.2 y aplicando la ecuación 3. Para aplicar dicha ecuación, es necesario conocer el espectro de acción eritematosa y el de radiación solar. El espectro de acción eritematosa viene tabulado en el Anexo C de la Norma ISO 24443:2012; mientras que el espectro de radiación solar se ha obtenido a partir de una gráfica publicada en la página científica Ocean Optics. En el Anexo I se encuentra una tabla con los valores para cada longitud de onda.

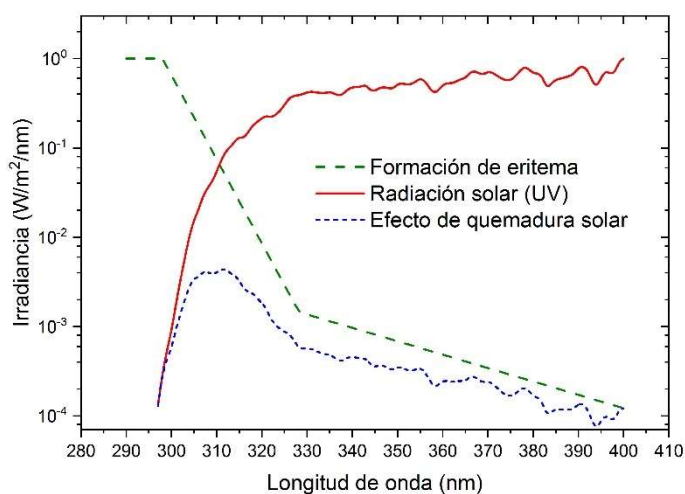


Figura 12- Espectros de radiación solar, de acción eritematosa y el producto de las dos, el riesgo de quemadura solar

6.1.4- Medición del SPF de protectores solares comerciales

Por otro lado, con intención de completar el estudio en torno a los protectores solares, se realizó también la medición del SPF de diferentes protectores solares que se encuentran en el mercado. El procedimiento de aplicación del producto sobre el sustrato es el explicado anteriormente, con la diferencia de que antes de depositar el protector sobre el sustrato, este era agitado en el interior del bote durante un tiempo de 30 segundos para favorecer, de esta manera, su correcta homogeneización.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

| Protector Solar | SPF hallado | SPF proporcionado |
|------------------------|-------------------|-------------------|
| <i>CienSun Classic</i> | $33,71 \pm 3,07$ | 50 ⁺ |
| <i>Nivea Sun Kids</i> | $61,02 \pm 5,23$ | 50 ⁺ |
| <i>Nivea Sun</i> | $36,26 \pm 4,71$ | 30 |
| <i>Avène</i> | $70,08 \pm 3,65$ | 50 ⁺ |
| <i>Aptonia</i> | $25,20 \pm 13,43$ | 30 |
| <i>Babaria Kids</i> | $32,01 \pm 6,21$ | 50 ⁺ |

Tabla 2- Valor del SPF de diferentes protectores comerciales

El último protector en cuestión, es uno de los dos que la OCU ha solicitado su retirada debido a que su SPF no se ajusta al especificado por la compañía. En nuestro caso, también se obtiene un valor ligeramente superior a 30, que el valor que según la OCU debería ser asignado a dicho protector.

A continuación, se muestra una gráfica con las transmitancias de los diferentes protectores solares, que son los valores que les hacen tener un SPF u otro, ya que los otros dos espectros (de radiación solar y de acción eritematosa) son constantes e iguales para todos los protectores.

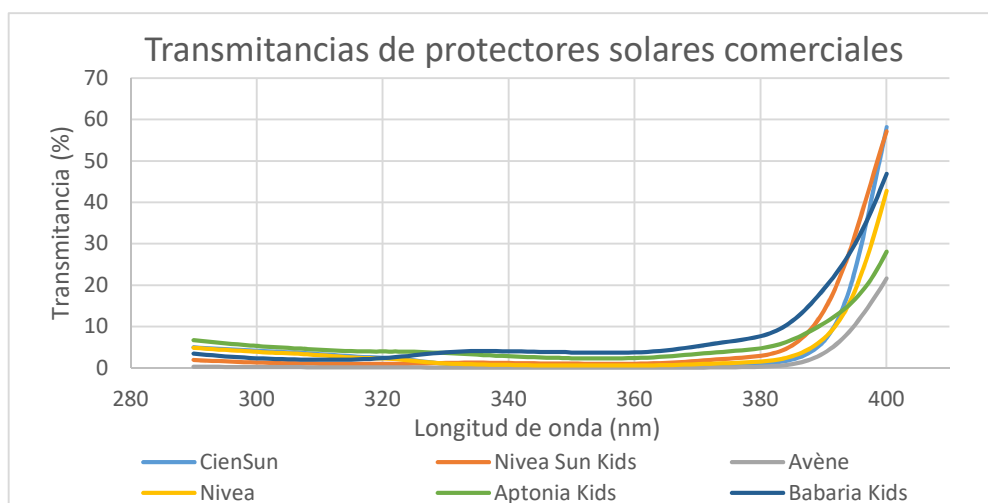


Figura 13- Transmitancias de protectores solares comerciales

6.2- Estudio de la cinética de crecimiento de *Anabaena* Sp.

La cinética de crecimiento es un factor clave a la hora del diseño de un proceso de producción en el que sean necesario microorganismos, ya que está relacionada con el tiempo que se tarda en conseguir una concentración deseada.

6.2.1- Inicio del cultivo y seguimiento

Se estudió de manera experimental en el laboratorio, la cinética de crecimiento de una especie de *Anabaena* que habita en medio marino (agua salada) y otra especie continental (agua dulce). Los biorreactores fueron operados hasta que se alcanzó la fase estacionaria. Ambas especies fueron obtenidas de la Colección del ICMAN_CSIC (Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía)

Se estudió el crecimiento de ambas especies por triplicado en reactores de 2 L cada uno con una aireación constante, la cual además de proporcionarles el oxígeno necesario, hacía que el todo el cultivo se encontrara homogéneo, evitando de esta manera que las microalgas decantaran por su propio peso sobre el fondo del reactor, lo cual frenaría su crecimiento. Dichos reactores tenían unas dimensiones de 12 cm de diámetro por 16 cm de alto y la aireación empleada era constante e igual a 1 litro por minuto.



Figura 14- Biorreactores empleados

Diariamente se fueron tomando muestras de todos los reactores, a las cuales se les medía la absorbancia utilizando un espectrofotómetro 10S UV-Vis de la compañía Thermo Scientific. Para dichas mediciones de absorbancia, entre los 200 y los 800 nm se empleaba una cubeta de cuarzo. La curva de crecimiento se realizó utilizando el dato de absorbancia a 680 nm, que es la longitud de onda a la cual absorbe la clorofila, considerándose la cantidad de esta proporcional a la cantidad de biomasa.

De manera semanal, también se seguía la viabilidad del cultivo para asegurarnos que no se veía sometido a un estresado muy grande y tuviera posibilidad de morir toda la población microalgal. Este seguimiento se realizó midiendo el Quantum Yield, el cual está relacionado con la viabilidad fotosintética del cultivo. Se obtuvieron siempre valores comprendidos entre 0,3 y 0,5, siendo el óptimo entre 0,5 y 0,7 de acuerdo a Bertrand Le Rouzic (2012).

La parte del biorreactor más cercana al foco de luz recibía una radiación fotosintéticamente activa (PAR) de $119 \mu\text{moles}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Dicha luminosidad era cuantificada utilizando un medidor de flujo cuántico de la empresa Apogee.



Figura 5- Medidor de radiación PAR

6.2.2- Preparación de los medios cultivo

Los medios de cultivo empleados para el crecimiento de ambas especies eran diferentes. La principal diferencia reside en el hecho de que para la elaboración del medio de cultivo para la especie continental se emplea agua destilada; mientras que para la especie marina se emplea agua de mar previamente filtrada empleando una bomba a vacío, ya que la composición de los medios aportaba fuentes similares de nutrientes. La fuente de carbono es CO_2 , introducido a través de una corriente gaseosa.

Ambos tipos de agua eran previamente esterilizados, bien utilizando un autoclave o bien mediante la aplicación de una dosis muy elevada de radiación UV, de manera que de esta forma se impide el crecimiento de cualquier otra especie, ya que resulta de vital importancia el hecho de tener un cultivo puro. Las composiciones de ambos medios vienen descritas en el Anexo IV.

6.2.3- Obtención de la relación Absorbancia-Concentración microalgal

Además de lo anteriormente explicado, se realizaron 2 rectas de calibrado, una para la especie continental y otra para la especie marina, que relacionaban la absorbancia con la concentración de biomasa (en unidades de masa).

El protocolo utilizado para la realización de las rectas de calibrado es el seguido y diseñado por los investigadores de FicoTecnología, del grupo de Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Cádiz.

Para la obtención de ambas rectas de calibrado se debe partir de un cultivo con un valor de absorbancia entre 1 y 1,5 a los 680 nm de longitud de onda. De dicho cultivo se obtienen al menos cinco diluciones: 100%, 75%, 50%, 25% y 10%.

Para hallar la concentración de los sólidos (biomasa microalgal) es necesaria la utilización de unos filtros Pall precombustionados en mufla y guardados en un desecador. Tras dicho procedimiento, cada filtro es pesado empleando una balanza de precisión (4 dígitos decimales), siendo este el peso inicial (P_i).

A continuación, se filtra un volumen conocido de muestra utilizando una pipeta automática de 5 mL. Los volúmenes filtrados varían de los 5 a los 20 mL en función del grado de dilución que se estuviera filtrando. Es importante que el filtrado se realice procurando que la biomasa filtrada abarque todo el soporte de filtración.



Figura 16- Filtrado de biomasa empleando una bomba a vacío

En el caso de la especie marina, es necesario realizar un lavado con agua mili-Q para arrastrar todas las sales que pudieran quedar retenidas en el filtro junto con la biomasa. El volumen de agua empleada para el lavado es igual al doble del volumen filtrado en cada caso. Dicho lavado se ha de realizar con movimientos circulares asegurándose que el agua abarcaba toda la superficie de filtrado.

Tras ello, se introducen los filtros, con la biomasa hacia arriba, 3 minutos de reloj en el microondas. A continuación, se les da la vuelta a los filtros y se vuelven a introducir en el microondas, esta vez, 2 minutos. Por último, se colocan en el desecador un tiempo no inferior a 20 minutos y una vez concluido este tiempo, se procede a realizar su pesada, siendo este el peso final (P_f).



Figura 17- Filtros preparados para la pesada final

Una vez finalizado el ya mencionado procedimiento, el cálculo de los sólidos en suspensión se realiza aplicando la siguiente ecuación.

$$\text{Biomasa (mg/L)} = \frac{P_f - P_i(g)}{V (mL)} * \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \quad (5)$$

Los resultados obtenidos para ambas especies son las siguientes (los cálculos se encuentran en el Anexo II):

| ANABAENA MARINA | |
|----------------------|----------------------|
| Absorbancia promedio | Promedio Conc. (g/L) |
| 1.0375 | 0.61 |
| 0.7635 | 0.425 |
| 0.5425 | 0.335 |
| 0.2725 | 0.153333333 |
| 0.1035 | 0.055 |
| 0 | 0 |

Tabla 3- Datos para la recta de calibrado de *Anabaena sp. marina*

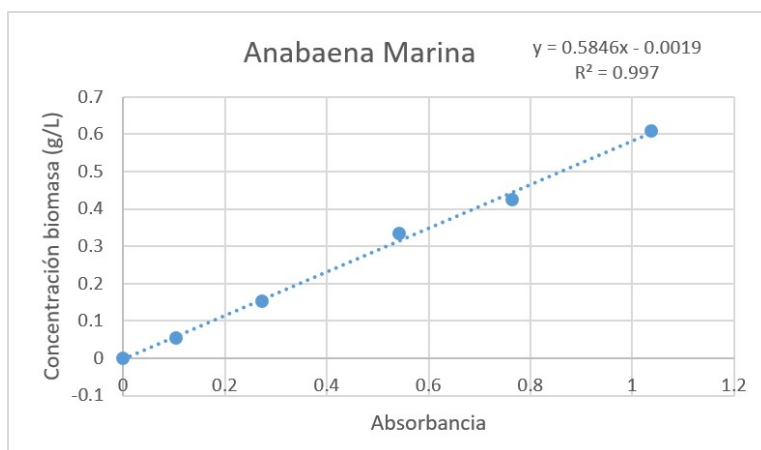
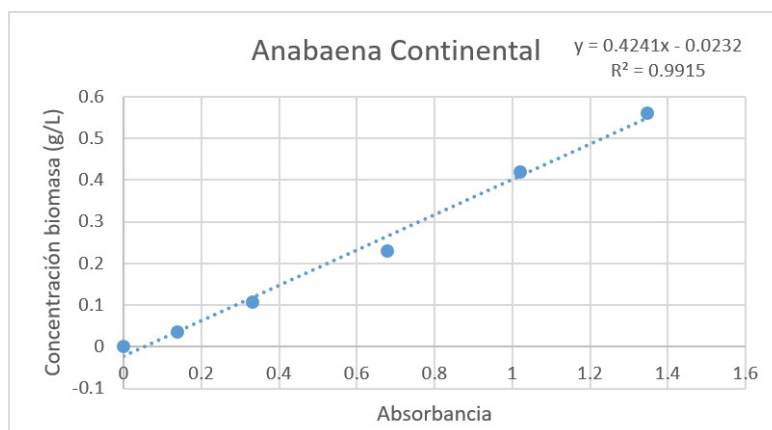


Figura 18- Recta de calibrado de *Anabaena sp. marina*

| ANABAENA CONTINENTAL | |
|----------------------|----------------------|
| Absorbancia promedio | Promedio Conc. (g/L) |
| 1.3465 | 0.56 |
| 1.02 | 0.42 |
| 0.679 | 0.23 |
| 0.3325 | 0.106666667 |
| 0.138 | 0.035 |
| 0 | 0 |

Tabla 4- Datos para la recta de calibrado de *Anabaena sp. continental*

Figura 19- Recta de calibrado de *Anabaena sp. continental*

6.2.4- Obtención de la cinética de crecimiento

Las regresiones de las gráficas obtenidas anteriormente, permiten elaborar una nueva, que relaciona la cantidad de biomasa con el tiempo, gracias a la obtenida inicialmente en la que se representa la absorbancia frente al tiempo. Este procedimiento experimental se realizó con el fin de estudiar la cinética de ambas especies, ya que es la primera vez que se trabaja con ella en la Universidad de Cádiz.

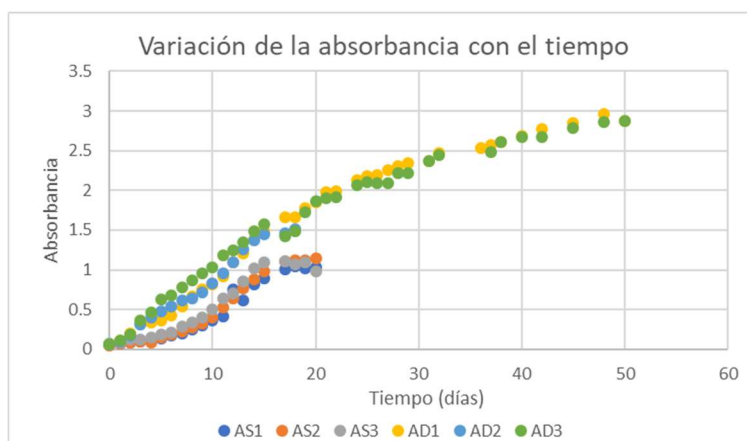


Figura 20- Variación de la absorbancia del cultivo con el tiempo

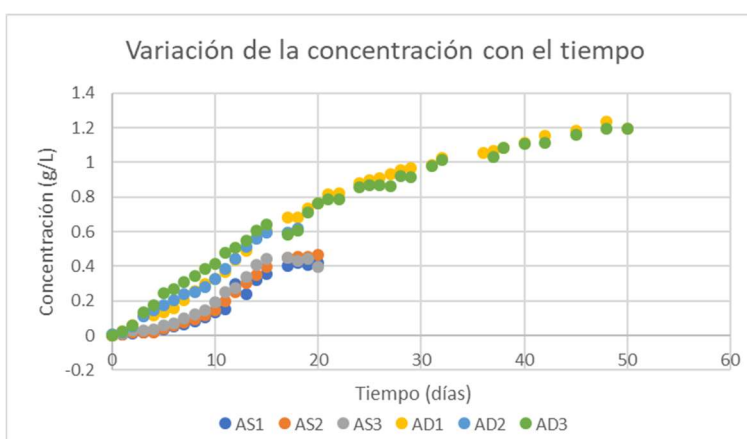


Figura 21- Variación de la concentración de biomasa con el tiempo

La nomenclatura AS hace referencia a los tres reactores en los que crecía la especie de *Anabaena sp.* que habita en agua salada; y AD hace referencia a los otros 3 reactores en los que crecía la especie que habita en agua dulce.

La modelización de la cinética de crecimiento se realizó empleando el modelo cinético logístico de Verhulst (Verhulst, 1838), el cual describe la evolución del crecimiento seguido experimentalmente en un reactor tipo batch, como es nuestro caso. El modelo de Verhulst es muy utilizado como modelo fundamental del crecimiento en estudios biológicos debido a su simplicidad y a su sencilla definición biológica. Matemáticamente se expresa de la siguiente manera:

$$\frac{\delta X}{\delta t} = \mu * X \left[1 - \frac{X}{X_m} \right] \quad (6)$$

Siendo:

- $\delta X/\delta t$: velocidad de variación de la biomasa con el tiempo.
- μ : velocidad específica de crecimiento.
- X : concentración de biomasa.
- X_m : concentración máxima de biomasa.

Dicha ecuación puede ser integrada considerando el valor inicial de biomasa como $X=X_0$ (en $t=0$). La ecuación resultante de integrar la ecuación del modelo logístico de Verhulst fue la usada para describir la velocidad de crecimiento hallada experimentalmente:

$$X = \frac{X_0 * X_m * e^{\mu * t}}{X_m - X_0 + X_0 * e^{\mu * t}} \quad (7)$$

Esta ecuación permite hallar todos los parámetros cinéticos mostrados en la tabla que se presenta a continuación. Los valores predichos por el modelo de Verhulst aparecen en el Anexo III. El coeficiente de correlación, R^2 , para la especie marina es bastante superior al 99%, y para las especies continentales es ligeramente inferior a este valor.

La productividad en batch ha sido calculada de acuerdo a la siguiente expresión, propuesta por Ruiz et al. (2102), que se puede considerar una mejor aproximación que la ecuación clásica de la productividad. Esto se debe a que esta propuesta excluye la fase de latencia y el comienzo de la fase estacionaria, por lo que la fase exponencial, que es la fase de interés, tendrá una mayor relevancia en el cálculo de la productividad.

$$\text{Productividad} \quad \frac{X_{90} - X_{10}}{t_{90} - t_{10}} = \frac{0,9 * X_m - 1.1 * X_0}{t_{90} - t_{10}} \quad (8)$$

$$\text{Productividad clásica} = \frac{\Delta X}{\Delta t} = \frac{X_m - X_0}{t_m - t_0} \quad (9)$$

A continuación, se presenta la curva de crecimiento de un reactor en el que crecía *Anabaena sp.* continental y otra en la que crecía *Anabaena sp.* marina, con sus datos cinéticos correspondientes. Las gráficas correspondientes a las otras curvas de crecimiento van incorporadas junto con todos los datos obtenidos necesarios para ello en el Anexo III, colocando estas a modo de ejemplo.

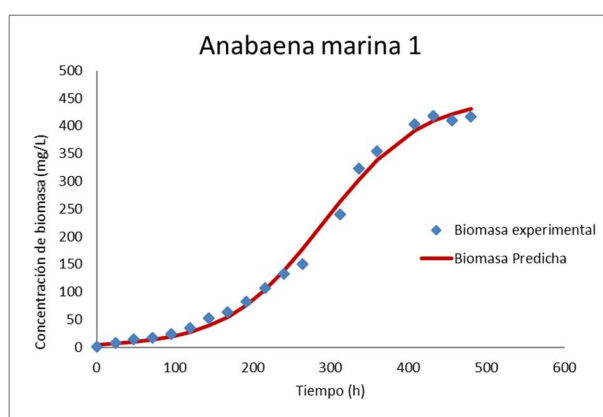


Figura 22- Cinética de crecimiento de *Anabaena sp.* marina en el reactor AS1

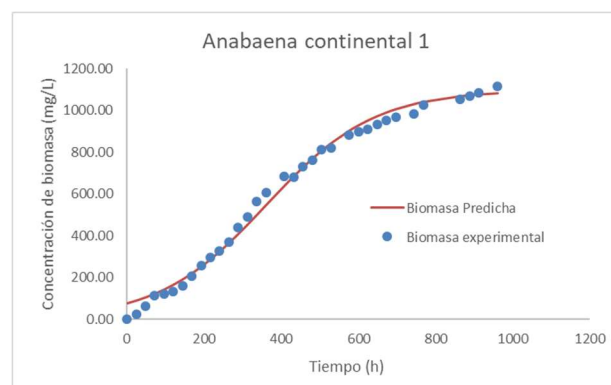


Figura 23- Cinética de crecimiento de *Anabaena sp.* continental en el reactor AD1

Los valores promedios de los parámetros característicos de la modelización obtenidos para ambos casos son:

| ANABAENA MARINA | | |
|-----------------|--------------------|---------|
| Parámetro | Unidad | Valor |
| X_0 | mg/L | 4,8 |
| X_m | mg/L | 471,83 |
| μ | h^{-1} | 0,0167 |
| R^2 | | 0,99406 |
| dX/dt | $mg L^{-1} h^{-1}$ | 1,09 |

Tabla 5- Parámetros de la modelización de la cinética de crecimiento de *Anabaena sp.* marina

| ANABAENA CONTIENTAL | | |
|---------------------|--------------------|---------|
| Parámetro | Unidad | Valor |
| X_0 | mg/L | 64,13 |
| X_m | mg/L | 974,2 |
| μ | h^{-1} | 0,00967 |
| R^2 | | 0,98714 |
| dX/dt | $mg L^{-1} h^{-1}$ | 1,52 |

Tabla 6- Parámetros de la modelización de la cinética de crecimiento de *Anabaena sp.* continental

Los resultados obtenidos en los triplicados son muy similares, pero la cinética de crecimiento de la especie que habita en medio marino difiere de manera notable de la cinética de la especie de agua dulce. Las curvas de crecimiento para la especie marina sí se ajustan muy bien al modelo empleado; en cambio la curva de la especie continental no se ajusta con tanta exactitud al modelo (R^2 ligeramente inferior a 0,99), debido a que no presenta una fase de latencia claramente diferenciada, sino que empieza a crecer muy rápidamente. Por este motivo, el modelo predice una concentración de partida superior a la real.

Se observa también que, en el caso de la especie continental, la cantidad de biomasa producida y su productividad son muy superiores a las obtenidas en el caso de la especie marina. Esto constituye un factor clave a la hora de decantarnos por dicha especie para el diseño de mi proceso a escala de planta piloto.

Sin embargo, se ha de prestar atención al hecho de que las productividades obtenidas son muy bajas. Para el caso de la especie continental, donde la productividad es más elevada, esta tiene un valor de $1,5 \text{ mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$, lo que equivale a $36 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$. Si comparamos estos resultados con valores de productividad de otras cianobacterias, se observa que, por ejemplo, en un estudio de Shen et al. (2009) encontramos que *Tetraselmis sp.* tiene valores de productividad de $414 \pm 11,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, frente a los $194 \pm 5,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de *Isochrysis sp.* Aunque este estudio se realizó en fotobiorreactores abiertos y en continuo, pudiendo ser esta la razón de la gran diferencia de resultados, puede analizarse que las condiciones en la que se ha estudiado la cinética no son las más adecuadas.

Se ha percibido que el género *Anabaena sp.*, presenta una fotoinhibición, siendo este la causa de la baja productividad. El modo en el que la radiación PAR inhibe el acrecimiento del citado género está aún por determinar siendo motivo de interés de estudios posteriores.

6.3- Optimización de la producción de micosporinas

Otro factor clave a la hora de decantarse por una especie u otra, es la cantidad de micosporinas que cada especie sea capaz de producir tras las condiciones de estresado, lo cual será estudiado en este apartado.

6.3.1- Estresado de las microalgas

La optimización del proceso se ha realizado mediante el estresado de las microalgas utilizando, para ello, un equipo en cuyo interior se encuentra una lámpara UV-B que emite con una potencia de 1W, con un máximo de emisión en los 311 nm (UV-B Narrowband PL_L/PL-S, Philips).



Figura 24- Montaje para el estresado celular

Para lograr el estresado, se pone en contacto, por circulación, un volumen de cultivo con la lámpara durante un tiempo continuado de 72 horas. Dicho equipo se ha de colocar verticalmente ya que, en el caso de situarse en disposición horizontal, las microalgas decantan en el interior del equipo permaneciendo dentro todo el periodo de experimentación, lo que hace que la dosis de radiación recibida sea demasiado elevada.

Durante el estresado, los reactores con el medio de cultivo estaban sometidos a una radiación fotosintéticamente activa inferior a la que tuvieron durante la fase de crecimiento. La especie continental recibía una radiación de $60 \mu\text{moles} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; mientras que la especie marina no tenía un foco de luz directo sobre ella debido al posible efecto de fotoinhibición observado.

6.3.2- Dosis aplicada

Se ha estudiado el estresado aplicando dos dosis de radiación diferentes, realizando experimentos con dos volúmenes de cultivos distintos: 0,95 L y 1,9 L, a los que corresponden dosis de radiación inversamente proporcionales. La dosis (J) puede definirse matemáticamente como:

$$\text{Dosis} = P * \frac{V_{\text{equipo}}}{V_{\text{cultivo}}} * t \quad (10)$$

El volumen del equipo (V_{equipo}) en el que se encontraba la lámpara era de 0,19 litros, luego conociendo la potencia con la que emitía la lámpara (P), 1 W, y el volumen de cultivo (V_{cultivo}), se puede calcular la dosis de aplicación recibida durante las 72 horas (t):

$$\text{Caso 1} \rightarrow \text{Dosis} = 1 * \frac{0,19}{0,95} * 72 * 3600 = 51,84 \text{ kJ}$$

$$\text{Caso 2} \rightarrow \text{Dosis} = 1 * \frac{0,19}{1,9} * 72 * 3600 = 25,92 \text{ kJ}$$

6.3.3- Estudio sobre la aplicación de las dosis

Por otro lado, se han estudiado diferentes maneras de aplicar una misma dosis. Esto se ha conseguido variando el caudal (relacionado con la frecuencia de giro, RPM, de la bomba peristáltica empleada) que circulaba a través del equipo.

De esta manera, a menores caudales, las microalgas se verán sometidas a una exposición más prolongada a la luz UV, aunque pasarán a través del equipo un número de veces inferior a los casos en los que se trabaja con caudales más elevados.

Todos los experimentos se realizaron para ambas especies de *Anabaena sp.*, tanto la marina como la continental. Los caudales de trabajo y la frecuencia de giro de la bomba utilizados fueron los siguientes:

- 3,525 L/h, que equivale a 25 RPM de la bomba peristáltica utilizada.
- 7,05 L/h, corresponde a 50 RPM.
- 10,575 L/h, equivale a 75 RPM.
- 14,1 L/h, equivale a 100 RPM.

De acuerdo a todo esto, se realizaron un total de 16 experimentos, de los cuales se determinó la cantidad de micosporina, antes y después del estresado. Las condiciones de los 16 experimentos vienen recogidas en la siguiente tabla:

| | Especie de <i>Anabaena sp.</i> | Volumen de cultivo (L) | RPM |
|----------------|--------------------------------|------------------------|-----|
| Experimento 1 | Continental | 0,95 | 25 |
| Experimento 2 | Continental | 1,9 | 25 |
| Experimento 3 | Marina | 0,95 | 25 |
| Experimento 4 | Marina | 1,9 | 25 |
| Experimento 5 | Continental | 0,95 | 50 |
| Experimento 6 | Continental | 1,9 | 50 |
| Experimento 7 | Marina | 0,95 | 50 |
| Experimento 8 | Marina | 1,9 | 50 |
| Experimento 9 | Continental | 0,95 | 75 |
| Experimento 10 | Continental | 1,9 | 75 |
| Experimento 11 | Marina | 0,95 | 75 |
| Experimento 12 | Marina | 1,9 | 75 |
| Experimento 13 | Continental | 0,95 | 100 |
| Experimento 14 | Continental | 1,9 | 100 |
| Experimento 15 | Marina | 0,95 | 100 |
| Experimento 16 | Marina | 1,9 | 100 |

Tabla 7- Experimentos de estresado realizados

6.4- Cuantificación de la cantidad de micosporinas

Para este procedimiento, se ha seguido un protocolo basado en el propuesto por Huang et al. (2016) con el fin de determinar la cantidad de micosporinas presente en las muestras. Para ello, se utilizaron dos disolventes orgánicos diferentes, como son acetona al 90 % y metanol 100 %, ya que, dependiendo del metabolito y de la microalga, no siempre un disolvente es más efectivo que otro.

6.4.1- Preparación de la biomasa previa a la extracción

Una vez realizado el proceso de estresado, se centrifuga el volumen total de cultivo utilizando, para ello, una centrífuga modelo Mixtasel-BL, de la compañía Selecta. Dicho proceso tiene el único objetivo de quedarnos con la biomasa húmeda. En los casos en los que se emplea la especie de agua marina, es necesario realizar un lavado con agua destilada, ya que, con la centrifugación, gran parte de las sales quedan formando parte del pellet junto con la biomasa.

El lavado se realiza siguiendo el protocolo de Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, de American Water Works Association (AWWA). Para ello, se emplea un volumen de agua destilada igual al doble de volumen de cultivo centrifugado. Para la comprobación de que dicho lavado se ha realizado de manera correcta se emplea un refractómetro, ya que mide la salinidad de los fluidos.



Figura 25- Refractómetro

Tras ello, la biomasa húmeda es liofilizada con el fin de obtener la biomasa seca, empleando un liofilizador Benchtop K, de VisTis. Antes de ser liofilizada, la biomasa tiene que ser congelada durante 24 horas a -80°C . El almacenamiento de la biomasa durante el tiempo comprendido entre la centrifugación y el momento de introducirla en el congelador a -80°C , se realiza en un arcón congelador a -20°C , de manera que no pierda sus propiedades.



Figura 26- Liofilizador empleado

6.4.2- Extracción de micosporinas

De cada muestra liofilizada se pesa una cantidad de 10 ± 1 mg por duplicado para cada disolvente empleado, utilizando, para ello, una balanza de precisión de la compañía Cobos. Cada muestra se molturó con una cantidad de sílica (silicon dioxide, Sigma-Aldrich) igual a la de su pesada usando un mortero durante un tiempo de 5 minutos. La cantidad molturada se pasó a un tubo de ensayo Pyrex de 10 mL junto con un volumen de 4 mL del disolvente para la extracción en cada caso.

Las muestras se almacenan a -20 °C durante 24 horas en oscuridad. Una vez transcurrido este periodo de tiempo, los tubos se centrifugan en una centrífuga Microcen 21 de la compañía OrtoAlresa a 4200 RPM durante 20 minutos, desechando el pellet y transfiriendo el sobrenadante a otro tubo Pyrex de iguales características al citado anteriormente.



Figura 27- Coloraciones diferentes en función del disolvente usado para la extracción

6.4.3- Cuantificación de la cantidad de micosporinas

Se determinó la densidad óptica de este sobrenadante desde los 200 nm de longitud de onda hasta los 800 nm, utilizando para ello un espectrofotómetro modelo Génesis 10S UV-Vis de la compañía Thermo Scientific. Cada medida se realizó por triplicado. Posteriormente se realizó el cálculo de la concentración de MAAs usando las ecuaciones propuestas por Huang et al. (2016). Las unidades resultantes al aplicar dichas ecuaciones son microgramos de MAAs por gramo de biomasa microalgal ($\mu\text{g MAAs/g biomasa}$).

Para el caso de la acetona al 90%, la ecuación a seguir es:

$$\frac{(12.25A_{663.6} - 2.55A_{646.6})(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})}{\text{Peso seco (g} \cdot \text{L}^{-1})} \times \frac{A_{MAAS}}{A_{Chla}} \times 1000 \quad (11)$$

En el caso del metanol 100%, la ecuación es la siguiente:

$$\frac{(15.64A_{666} - 7.34A_{653})(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})}{\text{Peso seco (g} \cdot \text{L}^{-1})} \times \frac{A_{MAAS}}{A_{Chla}} \times 1000 \quad (12)$$

Siendo $A_{663.6}$, $A_{646.6}$, A_{666} y A_{653} la absorbancia del extracto a esa longitud de onda y siendo A_{MAAS} y A_{Chla} el área bajo la curva en las longitudes de onda 308-353 nm y 621-704 nm, respectivamente. Para calcular el área bajo la curva se ha usado el programa OriginPro 2018.

Se obtuvieron datos de concentración de micosporina antes y después del estresado con luz ultravioleta. Se estimó que la cantidad de micosporinas antes del estresado es:

- Para *Anabaen sp.* continental de 9102 ± 280 $\mu\text{g MAAS/ g biomasa}$.
- Para *Anabaena sp.* marina de 8426 ± 537 $\mu\text{g MAAS/ g biomasa}$.

Los resultados obtenidos para los 16 experimentos de estresado son los siguientes (nota: todos los cálculos se encuentran en el Anexo V):

| | Caudal (L/h) | Dosis (kJ) | Conc. Micosporinas ($\mu\text{g MAAs/g biomasa}$) | |
|----------------|-----------------|---------------|--|-----------------|
| | | | Acetona | Metanol |
| Experimento 1 | 3,525 | 5,184 | 13729 \pm 783 | 13813 \pm 732 |
| Experimento 2 | | 2,592 | 12050 \pm 384 | 12183 \pm 265 |
| Experimento 3 | | 5,184 | 10533 \pm 624 | 5501 \pm 631 |
| Experimento 4 | | 2,592 | 11165 \pm 572 | 10888 \pm 903 |
| Experimento 5 | 7,05 | 5,184 | 12918 \pm 633 | 12960 \pm 368 |
| Experimento 6 | | 2,592 | 13430 \pm 568 | 13297 \pm 485 |
| Experimento 7 | | 5,184 | 11752 \pm 1391 | 6157 \pm 841 |
| Experimento 8 | | 2,592 | 7463 \pm 327 | 3690 \pm 284 |
| Experimento 9 | 10,575 | 5,184 | 12295 \pm 344 | 12361 \pm 211 |
| Experimento 10 | | 2,592 | 12589 \pm 252 | 12467 \pm 689 |
| Experimento 11 | | 5,184 | 8650 \pm 373 | 8106 \pm 492 |
| Experimento 12 | | 2,592 | 8681 \pm 625 | 9116 \pm 516 |
| Experimento 13 | 14,1 | 5,184 | 11473 \pm 664 | 11403 \pm 473 |
| Experimento 14 | | 2,592 | 8682 \pm 301 | 10139 \pm 466 |
| Experimento 15 | | 5,184 | 12744 \pm 245 | 12681 \pm 386 |
| Experimento 16 | | 2,592 | 7536 \pm 686 | 6659 \pm 510 |

Tabla 8- Concentración final de MAAs en los diferentes experimentos realizados

El color verde más oscuro hace referencia a *Anabaena sp.* continental, mientras que el verde más claro hace referencia a *Anabaena sp.* marina.

Observamos que los resultados obtenidos con los dos disolventes orgánicos empleados son muy similares en la inmensa mayoría de los casos, por lo que ambos resultan igual de efectivos para la cuantificación de la concentración de MAAs.

Se observa también que la especie continental es capaz de producir una cantidad superior de micosporinas, aumentando su concentración en hasta prácticamente un 50% respecto de la concentración inicial.

Puede verse también que, a medida que aumentamos el caudal de circulación, la concentración de micosporinas va disminuyendo, por lo que interesa trabajar con caudales pequeños, de manera que el tiempo dentro del equipo UV sea más prolongado.

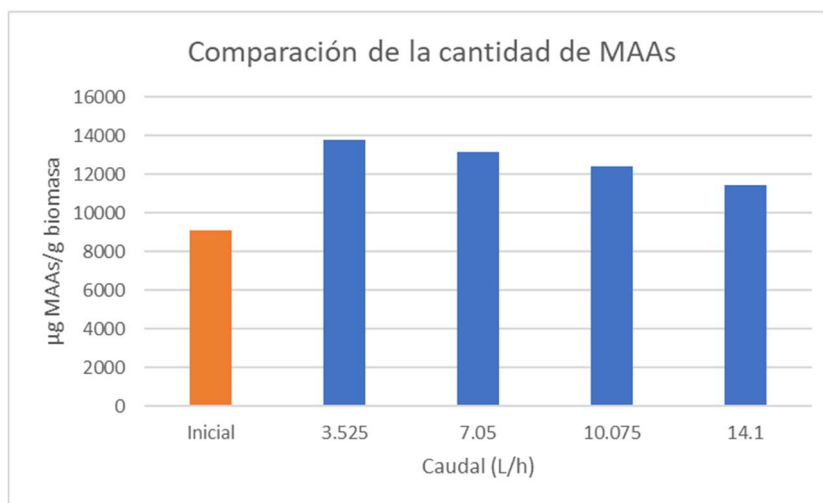


Figura 28- Comparación de la cantidad de MAAs

Respecto a la dosis, no se observa de una manera clara que una dosis sea más efectiva que otra, obteniéndose resultados muy similares.

6.5- Elaboración del protector solar

Para el diseño del protector solar en cuya composición formarán parte las microalgas como componente principal, se han utilizado, además de las citadas microalgas, compuestos químicos empleados en la preparación del Protector Estándar de homosolato y la patente WO 2012/093388 A2, siempre en concentraciones menores para tener la certeza de que su concentración no es peligrosa para la salud humana y teniendo en cuenta el Reglamento (CE) n.1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre los productos cosméticos. De las múltiples pruebas y combinaciones realizadas, el máximo SPF obtenido fue de 7,5 cuando la composición era la siguiente:

| Componente | masa (g) | % en masa |
|--------------------|----------|-------------|
| Biomasa microalgal | 0.3573 | 10.71364318 |
| KOH | 0.101 | 3.028485757 |
| 1-2 propanodiol | 0.2 | 5.997001499 |
| Trietanolamina | 0.096 | 2.87856072 |
| Lanolina | 0.1946 | 5.835082459 |
| MgSO ₄ | 0.0277 | 0.830584708 |
| H ₂ O | 2.3486 | 70.42278861 |
| TiO ₂ | 0.0098 | 0.293853073 |

Tabla 9- Composición del protector solar elaborado

Al no haber sido obtenido un resultado demasiado satisfactorio, se decidió cambiar de estrategia y elaborar un nuevo protector añadiendo biomasa microalgal al protector solar de CienSun, testado anteriormente.

De esta manera, se ha observado que, cuando se añadía un porcentaje de biomasa igual al 5% del total de la masa del protector, se ha producido un aumento del valor de su SPF siendo igual a 55, cuando experimentalmente se había hallado que el SPF de este protector era de 33.

A continuación, se muestra gráficamente la disminución de la transmitancia y, con ello, el aumento del SPF, cuando se añadía la biomasa al protector ya elaborado:

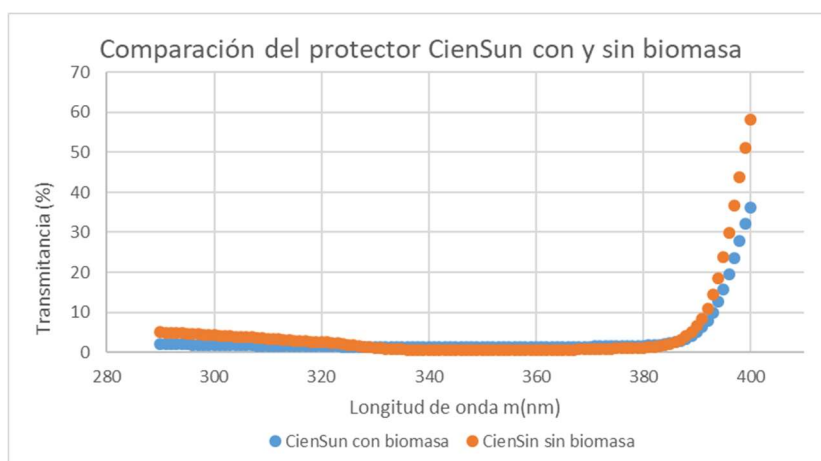


Figura 29- Comparación de las transmitancias del protector solar CienSun con y sin biomasa

A la hora de la elaboración de los protectores solares, se ha procurado el uso tanto de biomasa húmeda, es decir, antes de la liofilización, como seca. Se han obtenido siempre mejores resultados en las mediciones realizadas cuando se incorporaba biomasa seca, debido a que ofrecen una mayor reproducibilidad de los resultados obtenidos, puesto que cuando se probó con diferentes muestras de biomasa húmeda, las concentraciones no eran siempre iguales, originando grandes desviaciones en las mediciones.

7. Conclusiones experimentales

Medición del SPF

La primera conclusión obtenida, la cual resulta además muy importante de cara a la realización del presente Trabajo de Fin de Grado, es el hecho de que el método de medición del factor de protección solar es válido al encontrarse, el SPF obtenido en la medición del protector solar estándar de homosalato dentro del intervalo considerado por la FDA como válido. Por este motivo, el método ha sido empleado también para contrastar el valor del SPF de un conjunto de protectores solares comerciales.

Cinética de crecimiento

Se ha observado que la especie continental, es decir, la de agua dulce, alcanza unas concentraciones muy superiores a la que es capaz de alcanzar la especie que habita en agua salada; además, su productividad también es más elevada, lo que la hace más adecuada para trabajar con ella a nivel industrial, ya que nos permitirá optimizar los tiempos de crecimiento. A pesar de no tener evidencias aportadas por datos, parece ser que ambas especies, principalmente la marina, presentan fotoinhibición, lo cual puede resultar de interés para próximos estudios.

También es importante recalcar que la curva de crecimiento de la especie marina se ajusta muy bien al modelo matemático empleado, mientras que la continental no, ya que no presenta una fase de latencia diferenciada de la exponencial.

Estresado de *Anabaena sp.* para la producción de micosporinas

A la hora de realizar el estresado de las microalgas es muy importante asegurarse de que estas no quedan acumuladas en el interior del equipo de radiación UVB, por lo que debe disponerse en posición vertical. En caso de acumulación en el interior del equipo, la dosis de radiación recibida será demasiado alta.

De los resultados obtenidos del estresado, obtenemos las siguientes conclusiones:

- ✓ Los dos solventes empleados en la cuantificación, acetona al 90% y metanol 100%, son igual de efectivos.

- ✓ La especie continental produce una cantidad de MAAs tras el estresado superior a la inicial en casi un 50%, alcanzando más de 13000 microgramos de MAAs por gramo de biomasa; mientras que la marina incluso llega a disminuir su producción. Este dato unido a la cinética de crecimiento, hace a la especie continental mucho más efectiva, ya que crece más rápido y produce una mayor cantidad de MAAs.
- ✓ La producción de MAAs disminuye con altos caudales de circulación a través del equipo, por lo que interesa trabajar con caudales bajos para hacer que el periodo de tiempo de permanencia de la cianobacteria en el equipo de la lámpara UVB sea más prolongado.
- ✓ No se aprecia ninguna diferencia relevante entre el efecto de una dosis u otra, por lo que, a la hora de escalarlo, emplearemos la menor de ellas.

Elaboración del protector solar con microalgas

No ha sido posible elaborar un protector con un factor de protección elevado, siendo el máximo alcanzado de 7,5. Esto también puede ser un campo en el que continuar con investigaciones futuras.

En cambio, sí se ha demostrado la utilidad de *Anabaena sp.* al añadirla a un protector solar ya elaborado y patentado, haciendo que su SPF aumente de una manera muy notable.

8. Requisitos de diseño

El principal condicionante a la hora del diseño del proceso a una mayor escala es el dato que aparece en la propuesta del presente TFG, en la que se dice que la producción anual ha de ser 25 kg de biomasa microalgal.

Gracias a los datos obtenidos en el laboratorio de manera experimental se ha encontrado que *Anabaena sp.* continental es la más adecuada para el proceso por tres motivos fundamentales y contundentes:

- ✓ Se ha conseguido obtener una concentración de biomasa muy superior al caso en el que se usaba la especie marina, lo que implica que se necesitará un menor volumen de cultivo para obtener una misma cantidad de biomasa.
- ✓ La productividad, es decir, la variación de la cantidad de biomasa con respecto al tiempo, de la especie continental es más elevada, lo cual es un dato también muy favorable a la hora de optimizar el crecimiento, debido a que alcanzará la concentración deseada en un menor tiempo.
- ✓ Por último, y quizás lo más importante de cara a nuestro proceso de producción, la especie continental produce una cantidad superior de micosporinas, por lo que con una cantidad inferior de biomasa se podría obtener el mismo SPF que en el caso de usar la especie marina, al ser estos compuestos los encargados de absorber la radiación UV procedente del Sol.

Teniendo este dato en cuenta, lo que se procurará a la hora de diseñar el proceso a una escala superior (para poder producir los 25 kilogramos anuales) es imitar, en la medida de lo posible, el proceso global llevado a cabo a escala de laboratorio, ya que las etapas han de ser las mismas, con modificaciones en los equipos debido a la diferencia de caudales de trabajo.

Esto implica que, de todos los equipos empleados en el laboratorio, aquellos relacionados con el volumen deberán de ser modificados respecto a los propuestos en el presente TFG para el dimensionamiento del proceso. En cambio, los equipos de medida, tales como los espectrofotómetros, sí van a poder ser los mismos, ya que el mayor volumen de cultivo no afecta al uso de dichos equipos.

Es necesario para la elaboración del proyecto, seguir toda la normativa vigente de los diferentes organismos e instituciones que afecten de una manera directa, o indirecta, a lo que a nosotros nos concierne de cara al escalamiento a planta piloto, como, por ejemplo, las relacionadas con la contaminación, el nivel de decibelios producido y las derivadas de los materiales empleados.

9. Resultados de diseño

En este apartado se presentarán las soluciones elegidas para la materialización del presente proyecto, indicando las características de todas las opciones y operaciones seleccionadas. El diseño del proceso presenta las siguientes etapas:

- 1) Almacenamiento del medio de cultivo.
- 2) Crecimiento de la biomasa
- 3) Estresado celular
- 4) Cosechado de la biomasa
- 5) Obtención de biomasa seca

En los siguientes apartados, se irán explicando de una manera clara y concisa cómo se llevará a cabo el proceso de producción.

9.1- Crecimiento de la biomasa

9.1.1- Elección del sistema de cultivo

Para el crecimiento de la biomasa es necesaria la utilización de fotobiorreactores, que son aquellos reactores en los que se produce el crecimiento celular gracias a que dejan pasar la luz, de ahí su nombre. Para elegir el tipo de fotobiorreactor a emplear se han tomado las siguientes decisiones:

- ✓ Para el cultivo de microalgas existen dos grandes grupos de sistemas de cultivo, los “abiertos” y los “cerrados”. La principal diferencia es que, en los biorreactores abiertos, el cultivo está en contacto con la atmósfera; mientras que, en los biorreactores cerrados, el cultivo está aislado del medio ambiente mediante una separación física, normalmente transparente, lo que permite un mejor control de las condiciones de cultivo.

Se ha optado por la utilización de un biorreactor cerrado debido a que evita posibles contaminaciones por otros organismos, ya que es de especial interés que, en este caso, se consiga un monocultivo, puesto que se ha demostrado que *Anabaena sp.* produce una cantidad de micosporinas superior a la inmensa mayoría de cianobacterias, y no se puede olvidar que el fin de todo el proceso es que la biomasa microalgal sea empleada para la elaboración de un protector solar, para lo que es necesario la alta concentración de estos metabolitos.

- ✓ Dentro de este grupo de fotobiorreactores cerrados, se pueden distinguir los biorreactores de paneles planos, los tubulares y las columnas de burbujeo verticales. La opción seleccionada es la de las columnas de burbujeo, debido a la intención de simular, de la manera más parecida posible, lo realizado a escala de laboratorio, ya que en estas condiciones se han obtenido resultados muy positivos, y alterar las características de su crecimiento, puede provocar cambios en su producción de metabolitos.

Este tipo de fotobiorreactor presenta la desventaja de que su escalado es complicado, siendo a escala industrial el modelo tubular el más empleado para la producción de diversas microalgas. Pero, pese a ello, se ha decidido optar por el modelo de fotobiorreactor vertical, con el fin de asegurar la correcta producción de MAAs.

- ✓ Por último, dentro de este subgrupo se distinguen las columnas de burbujeo propiamente dichas, o los airlifts. Se ha optado por la utilización de este último modelo de fotobiorreactores, ya que favorecen el movimiento del cultivo de una manera más notable que las columnas de burbujeo, lo que favorece que todo el volumen de cultivo reciba la misma cantidad de luz, además de una correcta homogeneización de los nutrientes.

Puede decirse que este tipo de fotobiorreactores presentan las siguientes ventajas:

- Evitan cualquier tipo de contaminación por agentes externos.
- Utilizan agitación neumática, por lo que las fuerzas de cizalla en su interior son débiles, evitando cualquier tipo de daño celular.
- Son de fácil construcción.
- El burbujeo de aire favorece la transferencia de masa en su interior.
- Presenta un gran mezclado gracias a su estructura.

En resumen, el tipo de fotobiorreactor en el que se producirá el aumento de biomasa es un fotobiorreactor tipo airlift, que es un biorreactor tubular vertical cerrado.

9.1.2- Factores a tener en cuenta a la hora de operar un fotobiorreactor

A la hora de trabajar con un fotobiorreactor son varios los factores que se han de tener en cuenta con el fin de favorecer el crecimiento de los microorganismos, cianobacterias en el caso que nos concierne.

Modo de operación

Los reactores pueden operarse de tres maneras diferentes:

- a) Modo discontinuo o batch: es el modo más simple de operar, ya que el medio se aporta únicamente al inicio del cultivo y sobre él, se inocula la cepa de microalga que se desea cultivar. Tras una fase de adaptación inicial o de latencia, el microorganismo experimenta una segunda fase de crecimiento exponencial, alcanzando su concentración máxima. Transcurrida esta fase, comienzan a ser limitantes los nutrientes, manteniéndose la población de microalgas constante. Al comienzo de esta última fase se realiza el cosechado.
- b) Semicontinuo: en este caso, no se realiza una única cosecha final, sino que son varias. Tras cada cosecha, realizada al final de la fase exponencial, se añade medio de cultivo fresco para reponer el volumen de cultivo cosechado, de manera que el cultivo siempre se encuentra creciendo. Así, se puede llevar a cabo el cultivo durante varias semanas, manteniendo controladas las condiciones de operación cerca de sus valores óptimos. Sin embargo, presentan el inconveniente de que, la adición de medio fresco en repetidas ocasiones, puede producir fenómenos de estrés y la inducción de fases de adaptación que reducen el rendimiento de este tipo de procesos.
- c) Continuo: este modo de operación implica la presencia de un caudal de entrada con medio de cultivo constante en el tiempo, y otro igual, pero de salida con biomasa. Por este motivo es muy importante el estudio del cultivo para evitar que se produzca su lavado, esto es, quedarnos sin biomasa dentro del biorreactor. Tiene la ventaja de mantener constantes las condiciones de crecimiento del cultivo en sus valores óptimos, durante largos periodos de tiempo, aunque presenta el inconveniente de que la concentración máxima alcanzada será siempre menor a la conseguida cuando se opera en continuo o semicontinuo.

Para la realización del proyecto se ha optado por trabajar en semicontinuo ya que permite mantener el cultivo en fase exponencial (de máxima productividad) durante un largo periodo de tiempo, lo que posibilita alcanzar la concentración de biomasa deseada en un menor tiempo posible. El método en discontinuo no es útil a la hora de la producción de biomasa, ya que el cultivo experimenta una fase de latencia y el comienzo de la fase estacionaria, con un lento crecimiento.

En cambio, a escala industrial sí se opera en muchas ocasiones en continuo, pero en este caso, al haberse conseguido una productividad muy baja, el hecho de operar en continuo requeriría caudales de trabajo excesivamente pequeños, por lo que este modo de operación no será adecuado.

Luz

Las cianobacterias necesitan de la presencia de luz para poder realizar la fotosíntesis y así crecer. Es importante tener en cuenta que no toda la radiación es utilizada por las microalgas para realizar la fotosíntesis, sino tan solo una parte denominada radiación fotosintéticamente activa (PAR), comprendida entre los 400 y 700 nm aproximadamente, lo que supone en torno a un 40% de la radiación solar incidente.

La lógica parece indicar que, a mayor intensidad en la radiación, mayor será la velocidad de crecimiento, aunque esto no tiene por qué ser así. Determinadas microalgas sufren un fenómeno llamado fotoinhibición, es decir, que, a partir de un nivel determinado de radiación, esta empieza a ser perjudicial para la microalga.

De hecho, se observó en la fase experimental que *Anabaena sp.* experimenta fotoinhibición cuando la radiación PAR empieza a ser superior a los $100 \mu\text{moles}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, especialmente en la especie marina, pudiendo este hecho también afectar a la continental, aunque en menor grado.

En una ciudad como Cádiz, por ejemplo, la radiación PAR promedio a lo largo de un año es de $515 \mu\text{moles}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, o en Praga, mucho más al norte, es de $225 \mu\text{moles}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ (Fuente: Photovoltaic Geographical Information System, European Commission), siendo más del doble de radiación a partir de la cual empiezan a experimentar fotoinhibición.

Por este motivo, los fotobiorreactores para el cultivo de *Anabaena sp.* no pueden recibir directamente radiación solar, ya que su crecimiento no se produciría de forma óptima, sino que han de estar en el interior de una nave, con radiación artificial proporcionada por lámparas LED.

Nutrientes

La composición del medio de cultivo empleado proveerá a la cianobacteria de todos los nutrientes que necesite para crecer (nitrógeno, fósforo, azufre, vitaminas...) y en las concentraciones necesarias; a excepción del carbono, el cual se introducirá en el cultivo en forma de CO₂ junto con la corriente de aire. La composición del medio de cultivo para *Anabaena sp.* continental se encuentra en el anexo III.

El medio es adaptado de: Fábregas, J.; Domínguez, A.; Regueiro, M.; Maseda, A. & Otero, A. 2000. *Optimización of culture medium for the continuous cultivation of the microalga Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*: 53(5): 530-535.

Agitación

La agitación es necesaria, principalmente, para una correcta homogeneización del medio de cultivo y para impedir que las microalgas decanten en la base del reactor, de manera que su productividad disminuiría. El tipo de agitación empleada es la agitación neumática, es decir, producida gracias a una corriente gaseosa (rica en CO₂) que sale desde la base del biorreactor. En cultivos con microalgas es más adecuada que la agitación mecánica, ya que una alta frecuencia de giro del agitador puede ocasionar estrés celular o, incluso, su lisis.

pH

El rango de pH para la mayoría de los cultivos de microalgas está entre 7 y 9. Algunos autores coinciden que el crecimiento de las microalgas es óptimo a un pH neutro de 7.5 (Del Río et al., 2007; Martin, 2010). El pH óptimo en el cultivo se mantiene constante gracias a la aireación con aire enriquecido con CO₂, ya que el pH suele subir debido a la producción de oxígeno por la fotosíntesis, y la corriente gaseosa que constituye la aireación es la encargada de arrastrar el oxígeno disuelto acumulado.

Temperatura

La temperatura óptima de crecimiento de las microalgas se encuentra en torno a los 20 o 25°C. Se ha de pensar que estos organismos viven en mares y ríos, aunque sí es cierto que determinadas cianobacterias viven en aguas con temperaturas extremas.

Se ha comentado anteriormente que, debido a la fotoinhibición que sufre *Anabaena sp.*, los biorreactores se encontrarán en el interior de la nave de la planta piloto, luego los fotobiorreactores no recibirán la radiación solar y, por ello, no necesitarán ningún sistema de regulación de temperatura especial, puesto que no alcanzarán temperaturas demasiado elevadas. Bastaría con mantener la temperatura de la nave entre los 20 y los 25°C, por lo que los reactores también tendrán esta temperatura.

9.1.3- Dimensionamiento del Fotobiorreactor

Los reactores Airlift se diferencian de las columnas de burbujeo en que el fluido ascendente está separado físicamente del fluido descendente, como se muestra en la imagen de la derecha. El riser es el canal por el que asciende el fluido, debido a que ahí se produce la aireación mediante un difusor, y el downcomer es la zona de descenso del fluido. De esta manera, se favorece el movimiento del cultivo mucho más que en las columnas de burbujeo y otro tipo de reactores, logrando una excelente homogeneización y haciendo que todo el volumen de cultivo reciba la misma luz que, aunque en el caso de *Anabaena sp.* ha de ser poca, es muy importante que esté bien repartida

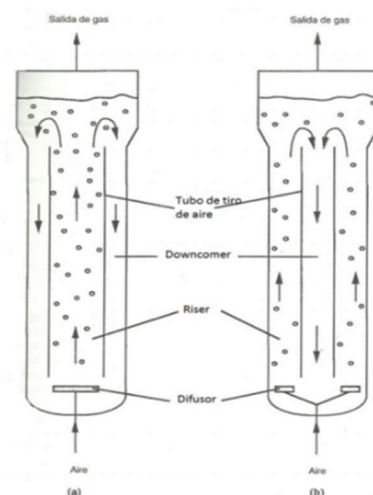


Figura 30- Esquema de reactores airlift (Doran, 1998)

Para el dimensionamiento del biorreactor se han seguido las siguientes condiciones:

- Sánchez et al. (2000) establecieron que el diámetro máximo para una buena disponibilidad de la luz es de 0,2 metros.
- Luo y Al-Dahhan (2011) establecen las siguientes relaciones sobre las dimensiones del airlift cuando el fluido es agua:

$$\frac{A_d}{A_r} = 1,1626 \quad (13)$$

$$\frac{L_t}{L_r} = 0,7 \quad (14)$$

Donde A_d y A_r son el área del downcomer y del riser, respectivamente, y L_t y L_r , la altura del fotobiorreactor y la del riser.

- La altura de los fotobiorreactores de columna debe encontrarse entre 1 y 4 metros (Ugwu et al., 2008; Wang et al, 2012).

De esta manera las dimensiones del fotobiorreactor diseñado son:

| Parámetro | Medida |
|------------------------------------|--|
| <i>Altura del airlift</i> | 2 metros |
| <i>Diámetro del airlift</i> | 0,2 metros |
| <i>Área de la base del airlift</i> | $0,0314 \text{ m}^2 = 314,16 \text{ cm}^2$ |
| <i>Volumen total</i> | $0,062832 \text{ m}^3 = 62,8 \text{ L}$ |
| <i>Altura del riser</i> | 1,4 metros |
| <i>Área del riser</i> | $145,27 \text{ cm}^2$ |
| <i>Área del downcomer</i> | $168,89 \text{ cm}^2$ |
| <i>Diámetro del riser</i> | 13,6 cm |

Tabla 10- Dimensiones del Fotobiorreactor para el crecimiento celular

A la hora de realizar los cálculos, se considerará un volumen útil del fotobiorreactor de 60 litros.

9.1.4- Número de fotobiorreactores

Para el cálculo del número de fotobiorreactores, se ha de tener en cuenta la concentración máxima de biomasa que se puede alcanzar, ya que ésta será cosechada cuando se alcance dicha concentración. A pesar de haberse alcanzado para *Anabaena sp.* continental una concentración cercana a 1 g/L, se considerará como concentración máxima 0,9 g/L, para evitar que el cultivo entre en fase estacionaria.

De esta manera, para una producción anual de 25 kg, se necesitará un volumen de cultivo de 27778 Litros. Para la subsanación de cualquier problema que pueda surgir en la planta, se hará la consideración de que el volumen de cultivo es de 30000 L.

Cada fotobiorreactor de 60L se operará, como se ha comentado, en semicontinuo, cosechando cada vez que se alcance dicha concentración 2/3 del volumen del reactor, es decir, 40 Litros. Al cultivo restante se adicionará medio de cultivo nuevo, siendo la concentración final igual a 1/3 de la inicial (0,3 g biomasa/L).

Gracias a la productividad obtenida experimentalmente, se ha calculado el tiempo transcurrido desde que se refresca el cultivo (concentración de 0,3 g/L), hasta que se alcanza la concentración deseada (0,9 g/L). El valor de productividad determinado experimentalmente es de $1,5 \text{ mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$, lo que supone un tiempo de 400 horas hasta alcanzar la concentración deseada, algo menos de 17 días.

Para el cálculo del tiempo, se ha empleado el dato de la productividad hallada en discontinuo, cuando a escala de planta piloto se operará en semicontinuo. Esta consideración se ha realizado debido a que, para el cálculo de la productividad, se ha empleado la ecuación 8 propuesta por Ruiz et al. (2012), en la que se elimina el tiempo perteneciente a la fase de latencia y estacionaria, quedándonos únicamente con la fase exponencial, que será el modo en el que se encontrará el cultivo en su fase de crecimiento.

Esto supone que, a lo largo de un año, el cultivo será cosechado 21,5 veces. Como no siempre las condiciones ambientales serán favorables y puede darse el hecho de que se muera el cultivo debido a las múltiples renovaciones, se ha considerado que cada biorreactor operará un total de 20 veces al año.

Considerando este último dato y que cada vez que se refresca se han cosechado 40 L de cultivo con biomasa, la producción anual de cada fotobiorreactor será de 800 L de cultivo con una concentración de 0,9 g biomasa/L.

Al necesitarse tratar un volumen total de 30000L, serán necesarios 38 fotobiorreactores de los propuestos anteriormente.

| | |
|---|---------------------------------------|
| <i>Productividad</i> | 1,5 mgL ⁻¹ h ⁻¹ |
| <i>Concentración máxima</i> | 0,9 g/L |
| <i>Volumen de 1 reactor</i> | 60 L |
| <i>Volumen de cultivo a tratar</i> | 30000 L |
| <i>Volumen tratado por 1 biorreactor al año</i> | 800 L |
| <i>Ciclos de operación de cada biorreactor</i> | 20 ciclos |
| <i>Número de biorreactores</i> | 38 fotobiorreactores |

Tabla 11- Datos para el cálculo del número de fotobiorreactores para el crecimiento celular

Estos fotobiorreactores, se colocarán en 4 filas paralelas. En la primera y la tercera fila habrá 10 fotobiorreactores, mientras que en la segunda y en la cuarta, habrá 9 en cada una de ellas; obteniéndose, así, el total de 38 reactores. Se denominará FB1FX a los fotobiorreactores más cercanos a la posición de la centrífuga de cada fila, FB2FX a los siguientes, y así, hasta FB10FX a los más alejados, siendo X la fila en la que se encuentran (Ver: plano 1).

9.1.5- Material del fotobiorreactor

Actualmente, debido a los avances en la Ingeniería de los Materiales, existen múltiples opciones a la hora de escoger el material para cumplir con los requisitos establecidos. En los fotobiorreactores, la principal cualidad a la hora de la elección del material ha de ser las características ópticas de este, ya que debe de dejar pasar la radiación. Además de esta, debe poseer las siguientes propiedades:

- Resistencia a la impermeabilidad del agua.
- Ser inerte a productos de limpieza como soluciones de ácido clorhídrico o hipoclorito de sodio.
- Fotoestabilidad: la luz y la radiación UV no deben alterar las propiedades ópticas del material.
- Bajo costo y disponibilidad
- Resistencia a las fuerzas de compresión debido a las presiones por la columna de agua contenida en su interior.
- Baja porosidad

Hay múltiples materiales que cumplen estas características, tales como el polimetilmetacrilato (PMMA), el poliestireno (PS), el policarbonato (PC), el vidrio, etc. Se ha optado por el diseño del fotobiorreactor el PMMA, el cual destaca por su transparencia y resistencia al rayado, además de ser un material de fácil termoformado y bastante económico.

9.2- Estresado de la biomasa

9.2.1- Fotobiorreactores para el estresado

Para esta etapa del proceso, también será necesaria la presencia de fotobiorreactores donde se encuentre la biomasa los tres días que dura el estresado celular por radiación UV. En este caso, los biorreactores serán simples columnas de burbujeo con un volumen útil de 40L, que es el volumen cosechado cada vez de los fotobiorreactores destinados al crecimiento de la biomasa.

Se han considerado, también, que estos fotobiorreactores para el estresado celular tendrán una altura de 2 metros, lo que les supone las siguientes dimensiones:

| Parámetro | Medida |
|-------------------------------|-----------------------|
| <i>Altura del biorreactor</i> | 2 metros |
| <i>Volumen total</i> | 40 L |
| <i>Área de la base</i> | 198,6 cm ² |
| <i>Diámetro de la base</i> | 15,9 cm |

Tabla 12- Dimensiones de los fotobiorreactores para el estresado

Para el estresado, se emplean un total de 10 fotobiorreactores en lugar de los 38 que son utilizados para el crecimiento de la biomasa, cada uno acompañado de un equipo con la lámpara UVB y una bomba que producirá la circulación del fluido. Puede hablarse de que hay 10 sistemas destinados al estresado celular. El fotobiorreactor más cercano a la posición de la centrífuga se denomina FE1 y el más alejado, FE10 (Ver: plano 7).

9.2.2- Equipo para el estresado por radiación UVB

El estresado será realizado mediante la aplicación de una dosis baja y controlada de radiación UVB, similar a la aplicada en el laboratorio, estimulando así la producción de micosporinas por parte de *Anabaena sp.* continental.

Se ha buscado un equipo lo más similar posible, pero de mayores dimensiones al empleado a escala de laboratorio. Se ha elegido, como mejor opción, por el modelo de lámpara UV PL-L 36W/01/4P1CT/25, de la compañía Philips, misma empresa que la del modelo usado en el laboratorio. Dicho equipo tiene el mismo rango de emisión que la lámpara con la que ya se ha trabajado, con el máximo de emisión en los 311 nm de longitud de onda, por lo que existe una relativa certeza de que el estresado será eficiente. Realizando una comparación entre este equipo y el empleado a escala de laboratorio se ha hallado que el volumen del equipo en el que se incluye la lámpara de UVB es de 0,47L aproximadamente. Las características de este modelo que resultan de interés a la hora del diseño vienen recogidas en la siguiente tabla:

| Características de la lámpara | Valor |
|--------------------------------|--------|
| <i>Potencia de emisión UVB</i> | 4,8 W |
| <i>Longitud</i> | 410 mm |
| <i>Diámetro</i> | 39 mm |
| <i>Volumen del equipo</i> | 0,47 L |

Tabla 13- Característica de la lámpara UVB para el estresado

Considerando la potencia de emisión, el volumen del cultivo (40L), el volumen del equipo que contiene la lámpara UV en su interior y el tiempo que dura el estresado, 72 horas, se puede determinar, aplicando la ecuación 10, la dosis a la que se ve sometida el cultivo. El valor hallado es de 14,62 kJ. Este valor se encuentra por debajo del intervalo comprendido entre las dos dosis utilizadas a escala de laboratorio. Por este motivo, se ha decidido utilizar dos lámparas de este modelo colocadas en serie, haciendo la consideración de que el volumen total será el doble, 0,94L.

$$Dosis = 4,8 * \frac{2 * 0,47}{40} * 72 * 3600 = 29,24 \text{ kJ}$$

Este valor sí se encuentra dentro del rango de estudio previo. Por ello, podemos considerar que la cianobacteria se comportará de igual manera a como lo ha hecho en la fase experimental. El tiempo del estresado se ha considerado el mismo que el empleado en dicha fase, ya que la distribución de la dosis a lo largo del tiempo, influye de una manera notable en el resultado sobre la biomasa.

Además, para la correcta aplicación de la dosis, el caudal que circula a través del equipo de estresado ha de ser proporcional a la relación de caudal y volumen de cultivo con el que se ha trabajado de manera experimental, puesto que el número de ciclos a los que está sometido el cultivo durante las 72 horas se debe tener en cuenta en el escalado. Por tanto, se ha determinado que el caudal de cultivo que debe pasar por el equipo de estresado ha de ser igual a 100 L/h.

| Características de trabajo | Valor |
|----------------------------|----------|
| <i>Dosis aplicada</i> | 29,24 kJ |
| <i>Caudal</i> | 100 L/h |

Tabla 14- Características de estresado a escala de planta piloto

9.3- Procesos de cosechado y secado de la biomasa

Una vez se ha realizado el estresado de la biomasa, las etapas posteriores han de ser establecidas de acuerdo a la obtención de la biomasa de manera que ésta pueda ser aprovechada. El fin del proceso es obtener la biomasa seca, por lo que serán necesario un mínimo de dos etapas para conseguir el objetivo:

- 1) Un proceso de separación mecánica que permita obtener la biomasa muy concentrada (biomasa húmeda) a partir del medio del cultivo.
- 2) Un proceso de secado que pueda tratar la biomasa húmeda obtenida en el primer proceso de separación y permita obtener la biomasa seca.

9.3.1- Obtención de la biomasa húmeda

De todos los posibles procesos de separación que permiten obtener biomasa húmeda (filtración, centrifugación, decantación...), se ha seleccionado como método más adecuado la centrifugación, ya que este tipo de equipos permite obtener la biomasa muy concentrada en un pequeño intervalo de tiempo. La filtración es también un método muy efectivo de separación de biomasa, pero se necesita de un material filtrante con un tamaño de poro muy pequeño, del orden de las micras, que impida el paso de las microalgas.

En determinados casos, es necesario que haya alguna operación de separación previa a la centrifugación, tales como la floculación, coagulación, flotación, etc. En el presente proyecto, se ha optado por no emplear ninguno de estos procesos, ya que se considera que la concentración es lo suficientemente alta como para poder prescindir de estos métodos de separación. El empleo de estos procesos hace que la centrifugación se realice de una manera más eficiente, pero suponiendo un aumento en el gasto de dinero y de tiempo. Además, dichos procesos son más efectivos cuando se trabaja con biorreactores abiertos, en los que se suelen alcanzar menores concentraciones.

Una vez decidido que la centrifugación es el método que mejor se ajusta a lo deseado, se ha de decidir qué tipo de centrífuga es más adecuada para nuestro proceso, si las de filtrado o las de densidad, siendo este segundo tipo más aconsejable para las aplicaciones biotecnológicas.

Dentro de este grupo, se va a emplear la centrífuga BTPX 305, de la compañía Alfa Laval. Está considerada como una centrífuga adecuada para las etapas de escalamiento de cultivo de microalgas. Presenta, además, un sistema de esterilización que hace que sea adecuada para todos los procesos en los que se vean implicados microorganismos.

| Características de la centrífuga | Valor |
|---|-----------------|
| <i>Capacidad hidráulica</i> | 3000 L/h |
| <i>Fuerza-G máxima</i> | 12800 |
| <i>Velocidad de giro</i> | 6000 – 9500 RPM |
| <i>Nivel de ruido</i> | 77 dB |

Tabla 15- Características de la centrífuga

El resto de las características se encuentran en el anexo XIV.

9.3.2- Obtención de la biomasa seca

De todas las operaciones de separación posibles que permiten obtener la biomasa seca, la que mejor se ajusta a nuestro procedimiento es la liofilización. Este proceso no implica que se alcancen temperaturas demasiado elevadas, lo que podría conllevar una degradación de las estructuras moleculares y celulares que componen la biomasa. Además, es un proceso muy eficiente, puesto que permite obtener la biomasa completamente seca, sin nada de agua, a diferencia de otros procesos de secado con los que pueden quedar restos de agua junto con la biomasa.

Otro proceso de secado muy eficiente es el spray drying, con el cual también se obtiene la biomasa completamente seca. La ventaja que presenta la liofilización frente a este método es que es muy fácilmente escalable, lo que supone un punto a favor para su elección.

Por todo ello, se ha optado por la liofilización como el método a utilizar para la obtención de biomasa seca. El modelo elegido es el Lyolab 0.3, de la compañía CoolVacuum Technologies, el cual es catalogado por la empresa fabricante como un liofilizador adecuado para planta piloto.

Son de especial interés las siguientes características:

| Características del liofilizador | Valor |
|---|------------------|
| <i>Capacidad del condensador</i> | 6 kg |
| <i>Número de bandejas</i> | 3 + 1 |
| <i>Temperatura final</i> | -85°C |
| <i>Nivel sonoro</i> | Inferior a 68 dB |

Tabla 16- Características del liofilizador

El resto de características vienen recogidas en el anexo XV.

Previamente a la liofilización, se ha congelar la biomasa obtenida en un arcón congelador. Se ha optado por el modelo Combatep S-40, del Grupo-Selecta. Ha sido elegido por sus reducidas dimensiones y su capacidad de alcanzar una temperatura de hasta -45°C. Todas sus características vienen recogidas en el Anexo XXII.

9.4- Tanques de almacenamiento

9.4.1- Equipo utilizado

De acuerdo a la organización de las etapas para el proceso de producción, solo es necesaria la utilización de tanques de almacenamiento para contener el medio de cultivo antes de ser utilizado para alimentar los fotobiorreactores. El resto de las etapas está completamente enlazado de manera que no sea necesario almacenar en tanques nada más, optimizando así tiempo y recursos.

La única característica que debe presentar el tanque de almacenamiento es que debe mantener condiciones asépticas, ya que el fluido que contiene es un simple medio de cultivo, que no presenta propiedades específicas que haga necesario que el tanque de almacenamiento sea de un material en particular.

Se necesitan dos tanques de alimentación, uno contendrá el medio para las dos primeras filas de reactores y el otro para la tercera y la cuarta fila. Los depósitos seleccionados tienen un volumen de 2150 L y las siguientes dimensiones:

| | |
|-----------------|--------|
| <i>Volumen</i> | 2150 L |
| <i>Diámetro</i> | 1,4 m |
| <i>Altura</i> | 1,74 m |

Tabla 17- Dimensiones del Tanque de almacenamiento

Son unas cisternas de Poliéster Reforzado con Fibra de Vidrio (PRFV) y, entre otras aplicaciones, están destinadas al almacenamiento de agua potable. Las especificaciones del equipo, elaborado por la compañía Tapidol S.L., están especificados en el anexo XVI. Todos los depósitos fabricados por Tapidol están provistos de una barrera interior de resinas sanitarias, idóneas para contener agua potable o productos alimenticios, cumpliendo con la “Normativa Básica para Instalaciones Interiores de Suministro de Agua” dictada por el Ministerio de Industria.

9.4.2- Esterilización del medio de cultivo

Cada tanque de almacenamiento ha de llevar asociado un equipo para asegurar la esterilidad del medio de cultivo que se encuentra en su interior. La esterilización se consigue gracias a la circulación del medio de cultivo a través de un equipo con una lámpara UV, la cual es capaz de suministrar una dosis muy elevada de radiación ultravioleta, eliminando cualquier forma de vida presente en el medio.

Se ha optado por el método de esterilización por UV debido a su alta eficacia y poco tiempo y material necesario para ello. Otros métodos de esterilización descartados comprenden el uso de productos químicos, ya que supone una alteración del medio de cultivo, o el uso de altas temperaturas, no siendo económicamente viable debido al gran volumen de cultivo con el que se trabaja.

El equipo elegido es el modelo UVA-12C de la compañía Polaris, el cual es capaz de emitir con una potencia de 39W con una longitud de onda nominal de 254 nm. De acuerdo a la empresa, la dosis de radiación UV producida es de, al menos, 30000 $\mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$, incluso en las últimas horas de funcionamiento de la lámpara. Dicha dosis es suficiente para destruir la mayoría de los microorganismos, tales como bacterias, hongos y microalgas. Las características de este equipo vienen especificadas en el Anexo XVII.

9.4.3- Agitación del medio de cultivo

La homogeneización del medio de cultivo se realiza empleando la aireación, de igual manera que los fotobiorreactores, por lo que el citado equipo deberá tener una entrada por la parte inferior para el aire. Este método es más económico que la agitación mecánica, de ahí que sea la solución elegida, puesto que no supone ningún coste adicional.

9.5- Agitación de los cultivos

Los reactores airlift, tanto los destinados al crecimiento como los destinados al estresado, serán agitados mediante aireación. Los agitadores mecánicos no son recomendables cuando se opera con fotobiorreactores, ya que causan elevadas fuerzas de cizalla en el interior de estos, capaces de ocasionar la lisis celular de las microalgas. Además de cómo método de agitación, la aireación permite el aporte de carbono en forma de CO_2 que las cianobacterias, como organismos autótrofos que son, necesitan para poder crecer.

9.5.1- Compresor

Para la aireación será necesario un compresor que tome aire de la atmósfera (ventiladores y soplantes no son capaces de proporcionar la presión necesaria) para introducirlo en los fotobiorreactores por su base. De esta manera, debido a su baja densidad, al aire ascenderá y saldrá por la parte superior, favoreciendo el movimiento del cultivo en el interior del fotobiorreactor, el aporte de CO_2 para las microalgas y la regulación del pH por la retirada del oxígeno disuelto producido en la fotosíntesis.

Es necesaria la presencia de unos filtros de aire para evitar, de esta manera, que los microorganismos que transporta el aire lleguen al cultivo y puedan crecer en él, además de cualquier otro pequeño sólido en suspensión que pueda ir en la corriente gaseosa, lo cual también podría suponer una fuente de contaminación.

Se ha estimado que el caudal total de aire necesario para la aireación de todos los fotobiorreactores es de 98 L/min, ya que se alimentarán los fotobiorreactores (los 38 destinados al crecimiento y los 10 destinados al estresado) con un caudal de 2 L/min cada uno de ellos, y los dos tanques de almacenamiento con un caudal de 1 L/min.

Los compresores tienen el inconveniente de que producen un gran ruido, alcanzando más de 75 dB, lo cual es perjudicial para la salud si se está más de media hora expuesto a esta intensidad sonora. Por ello, se ha estimado que un compresor que se ajusta bien a las necesidades es el Compresor PRO 24 SILENT, el cual presenta las siguientes dos características de gran importancia:

| | |
|--------------------------|-----------|
| <i>Caudal máximo</i> | 150 L/min |
| <i>Intensidad sonora</i> | 62 dB |

Tabla 18- Características del compresor

De esta manera, el compresor puede encontrarse en el interior de la nave, sin necesidad de estar en un edificio anexo. El resto de características están recogidas en el anexo XVIII.

9.5.2- Aporte de CO₂

Se ha comprobado que el aire no es capaz de aportar una cantidad de CO₂ necesaria para que se cumpla la relación de RedField, que relaciona las proporciones de los nutrientes esenciales para que pueda darse el crecimiento de cualquier microorganismo (relación C:N:P = 106:16:1) para la presente operación en semicontinuo, por lo que resulta conveniente un aporte extra de CO₂.

Se ha calculado que una botella que contiene 38 kg de CO₂ a presión, permite que se cumpla perfectamente la relación de RedField, por lo que el cultivo tendría concentraciones de nutrientes óptimas para su adecuado crecimiento. Como no se ha de olvidar que parte del CO₂ escapa a la atmósfera al no ser asimilado, es conveniente trabajar con un exceso de este. Los cálculos están realizados en el anexo XXI

9.6. Sistema de bombas, tuberías y accesorios

9.6.1- Tuberías para líquidos y gases

Al no tener los líquidos a transportar, tanto el medio de cultivo como el cultivo en sí, ninguna característica que pueda dañar el conducto, se ha optado por utilizar tuberías de un material económico, puesto que no requiere ninguna propiedad en especial. En este caso, el material de las tuberías es el PVC, ya que presenta las siguientes características:

- Económico y de alta disponibilidad.
- Baja pérdida de carga.
- Ligero y de fácil instalación.
- Alta flexibilidad.

Las tuberías que se utilizarán tendrán un diámetro nominal, DN, de 40 mm, con un espesor de 3 mm, lo cual equivale a un diámetro interno de 34 mm, el cual permite el cálculo del área de paso.

Son necesarias las tuberías en los siguientes casos:

- Recirculación del medio de cultivo a través del equipo de esterilización cuando está contenido en el tanque de almacenamiento.
- Transporte del medio de cultivo desde los tanques de almacenamiento hasta los biorreactores para el crecimiento de la biomasa: de cada tanque sale una tubería que se bifurca en dos, cada una de las cuales alimentará a una fila de biorreactores.
- Transporte del cultivo desde los fotobiorreactores para el crecimiento hasta los fotobiorreactores para el estresado. Las salidas de todos los fotobiorreactores que ocupen una misma posición en su fila, como, por ejemplo, FB1FX (es decir, FB1F1, FB1F2, FB1F3, FB1F4) estarán conectados hasta el fotobiorreactor de estresado 1, FE1. De igual manera para los reactores del resto de posiciones.
- Recirculación a través del equipo que contiene la lámpara UV para que se produzca el estresado celular.
- Transporte del cultivo tras el estresado, desde los 10 fotobiorreactores disponibles para ello, hasta la centrífuga.

Los circuitos formados por tuberías (y otros accesorios) recibirán la siguiente nomenclatura, de cara a facilitar el cálculo de la pérdida de carga:

- Circuito A: para la recirculación del medio de cultivo en el tanque de almacenamiento.
- Circuito B: desde el tanque de almacenamiento hasta el fotobiorreactor FB1FX, que es el más alejado de su posición, luego es el que experimentará una mayor pérdida de carga en el recorrido.
- Circuito C: desde cada fotobiorreactor de la fila 1, FBXF1 (más alejada de los reactores de estresado) hasta los fotobiorreactores de estresado, FEX. Las otras filas de fotobiorreactores, al encontrarse más cerca de los fotobiorreactores para el estresado, el fluido experimentará una menor pérdida de carga.
- Circuito D: para el estresado celular, haciendo que el cultivo pase a través de la lámpara UV.
- Circuito E: desde el FE10, que es el más alejado de la centrífuga, hasta esta.

La numeración establecida queda explicada visualmente en los planos del 4 al 8.

Los gases serán transportados en tuberías de acero al carbono, las cuales son capaces de resistir mayores presiones ejercidos por estos. Las tuberías para gases son necesarias para el transporte de la corriente gaseosa en los siguientes casos:

| | Descripción | L | L (25%) | P ₁ (Pa) | P ₂ (Pa) | P ₂ (bar) |
|-------------------|--|----|---------|---------------------|---------------------|----------------------|
| <i>Circuito 1</i> | Del compresor a los fotobiorreactores de crecimiento | 10 | 12,5 | 800000 | 120948 | 1,20948 |
| <i>Circuito 2</i> | Del compresor a los fotobiorreactores de estresado | 13 | 16,25 | 800000 | 120948 | 1,20948 |
| <i>Circuito 3</i> | Del compresor a los tanques de almacenamiento | 4 | 5 | 800000 | 118005 | 118005 |

Tabla 19- Condiciones de los conductos de aire

La presión 1 es la aportada por el compresor, mientras que la presión 2 es la que hay en la base de los equipos que necesitan aireación, por lo que debe ser la presión mínima con la que llegue el aire a dicho punto para poder entrar y, con ello, ascender debido a su baja densidad, provocando la aireación.

9.6.2- Bombas

Las bombas son aquellos equipos necesarios para la impulsión de líquidos a través de conductos cuando no pueden ser transportados por acción de la gravedad. En todos los casos de transporte de líquidos que se producen en la planta, es necesaria la presencia de una bomba que le aporte la energía suficiente.

Se ha procurado emplear el menor número de bombas con el fin de optimizar los recursos económicos de manera que:

- La bomba utilizada para la esterilización del medio de cultivo es la misma que la empleada para el transporte del medio de cultivo desde el tanque de almacenamiento hasta los fotobiorreactores. Para facilitar la nomenclatura, esta será la Bomba 1.
- La bomba encargada de la circulación del cultivo durante el estresado celular es la misma que la empleada para el transporte del cultivo desde los fotobiorreactores destinados al crecimiento hasta los fotobiorreactores destinados al estresado. Esta será la bomba 2.

La bomba 1 es una bomba centrífuga, capaz de impulsar un caudal elevado para que, tanto la esterilización del medio de cultivo como el llenado de los fotobiorreactores, se produzca de manera rápida y efectiva. El modelo elegido es el Niza 4.4 de la compañía Bombas Hasa, la cual es capaz de impulsar hasta un caudal de 4800 L/h (asociado a dicho caudal una altura manométrica de 10 metros de agua). Todas sus características se encuentran en el anexo XX.

La bomba 2 ha de impulsar el cultivo, el cual contiene biomasa, no siendo una bomba centrífuga recomendable para este caso. Por este motivo, se empleará una bomba peristáltica, que se encuentra dentro del grupo de las bombas de desplazamiento positivo.

Las bombas peristálticas son muy utilizadas para la impulsión de cultivos con microorganismos, ya que no ejercen una presión muy elevada y no los someten a estrés o, incluso, lisis celular. Esta bomba 2 es el modelo I12 de la compañía Peribest, que cumple con las condiciones establecidas, siendo su caudal de impulsión máximo igual a 205 L/h. Sus características se encuentran en el anexo XX.

En el conjunto de las bombas tipo 2, habrá un modelo capaz de impulsar un volumen mayor de fluido, el asociado al biorreactor de estresado FE1, el más cercano a la centrífuga. De esta manera, dicha bomba será la encargada de impulsar todo el cultivo, de los 10 fotobiorreactores de estresado, hacia la centrífuga, ya que los 10 sistemas de estresado (fotobiorreactor más lámpara UV) estarán también conectados en serie. La

citada bomba es el modelo I17 de la misma compañía, pudiendo impulsar un caudal máximo de 500 L/h. Todas sus características se encuentran en el Anexo XX.

| | Modelo I12 | Modelo I17 |
|-----------------------------------|------------|------------|
| <i>Caudal máximo</i> | 205 L/h | 500 L/h |
| <i>Tª máxima</i> | 80 °C | 80 °C |
| <i>Presión máxima de descarga</i> | 10 bar | 10 bar |

Tabla 20- Características de los modelos de bombas peristálticas I12 e I17

9.6.3- Accesorios

La presencia de accesorios es necesaria para dirigir el fluido de un equipo a otro, marcando estos el camino a seguir. Son necesarios accesorios en los siguientes casos:

- A la salida del tanque de almacenamiento, tras el paso por la bomba 1, hay una bifurcación que hará que el fluido vuelva recirculado o se dirija hasta los fotobiorreactores. Para ello, es necesario una válvula de corte.
- En el caso de que el medio se dirija hacia los fotobiorreactores, como cada tanque de almacenamiento alimenta a 2 filas, debe haber una bifurcación que haga que el fluido se dirija a una fila u otra. Se necesita otra válvula de corte.
- La alimentación de cada fila de fotobiorreactores llega a través de un único conducto, por lo que a la entrada de cada biorreactor (por su parte superior), debe de haber una válvula que permita el llenado únicamente del fotobiorreactor de interés.
- Al estar las salidas de todos los fotobiorreactores que ocupan la misma posición de las 4 filas conectados para el llenado del biorreactor de estresado correspondiente a esa posición, debe haber válvulas de tres vías que impidan el paso del contenido de un reactor a otro.
- En cada sistema de estresado, justo antes de cada bomba, ha de haber una válvula que permita que los 10 sistemas de estresado funcionen de manera independiente o estén todas las salidas conectadas para el transporte de la biomasa hasta la centrífuga.
- El diámetro de tubería es superior al diámetro de succión y aspiración de la bomba centrífuga, luego será necesario un ensanchamiento y un estrechamiento.

9.6.4- Pérdida de carga en tuberías y accesorios

En la siguiente tabla se recoge la longitud de tubería de cada circuito y los accesorios de cada uno de ellos. El diseño de las tuberías, o Piping, será realizado por un arquitecto, persiguiendo el fin de optimizar al máximo el recorrido de cada conducto. Por este motivo, se desconoce la longitud exacta de tubería y el número de codos. Debido a esto, se ha decidido calcular la pérdida de carga suponiendo una longitud superior en un 25% de la longitud mínima calculada y duplicando el número de codos necesarios. Las ecuaciones empleadas se recogen en el anexo XIX.

| | Función | L mínima (m) | L (25%) (m) | accesorios mínimos | accesorios |
|-------------------|---|--------------|-------------|---|---|
| <i>Circuito 1</i> | Esterilización medio de cultivo | 4,95 | 6,1875 | 4 codos, 1 válvula de corte | 8 codos, 1 válvula de corte, 1 ensanchamiento, 1 estrechamiento |
| <i>Circuito 2</i> | Transporte del medio a los fotobiorreactores de crecimiento | 10,35 | 12,9375 | 5 codos, 2 válvulas de corte, 9 válvula de 3 vías | 10 codos, 2 válvulas de corte, 9 válvulas de 3 vías, 1 ensanchamiento, 1 estrechamiento |
| <i>Circuito 3</i> | Transporte de la biomasa hasta los fotobiorreactores de estresado | 12,4 | 15,5 | 4 codos, 4 válvulas de tres vías | 8 codos, 4 válvulas de 3 vías |
| <i>Circuito 4</i> | Estresado de la biomasa | 3,9 | 4,875 | 8 codos, 1 válvula de 3 vías | 16 codos, 1 válvula de 3 vías |
| <i>Circuito 5</i> | Transporte de la biomasa hasta la centrifuga | 9,15 | 11,4375 | 3 codos, 9 válvulas de 3 vías | 6 codos, 9 válvulas de 3 vías |

Tabla 21- Circuitos de tuberías y accesorios

Las pérdidas de carga en las tuberías de cada circuito se recogen en la siguiente tabla:

| | Circuito 1 | Circuito 2 | Circuito 3 | Circuito 4 | Circuito 5 |
|---------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| f | 0,025 | 0,03 | 0,034360321 | 0,054976514 | 0,013744128 |
| $L (m)$ | 6,1875 | 12,9375 | 15,5 | 4,875 | 11,4375 |
| $Di (m)$ | 0,034 | 0,034 | 0,034 | 0,034 | 0,034 |
| $Q (m^3/s)$ | 0,00055556 | 0,000277778 | 4,44444E-05 | 2,77778E-05 | 0,000111111 |
| $S (m^2)$ | 0,00090792 | 0,00090792 | 0,00090792 | 0,00090792 | 0,00090792 |
| $v^2 (m/s)$ | 0,37442045 | 0,093605112 | 0,002396291 | 0,000936051 | 0,014976818 |
| $2 \cdot g (m/s^2)$ | 19,62 | 19,62 | 19,62 | 19,62 | 19,62 |
| $h_f (m)$ | 0,08682341 | 0,05446196 | 0,001913157 | 0,000376074 | 0,003529311 |

Tabla 22- Pérdida de carga en tuberías

A continuación, se recoge la pérdida de carga debido a los accesorios

| | Circuito 1 | Circuito 2 | Circuito 3 | Circuito 4 | Circuito 5 |
|-------------------------------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| K válvula 3 vías | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| N° válvulas 3 vías | 0 | 9 | 4 | 1 | 9 |
| K válvula de corte | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| N° válvulas de corte | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| K codo corto 90° | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 |
| N° codo corto 90° | 8 | 10 | 8 | 16 | 6 |
| K ensanchamiento | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| N° ensanchamiento gradual | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| K estrechamiento | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| N° estrechamientos gradual | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| S (m^2) | 0,00090792 | 0,0009079 | 0,00090792 | 0,00090792 | 0,00090792 |
| Q (m^3/s) | 0,00055556 | 0,000277 | 4,44444E-05 | 2,77778E-05 | 0,000111111 |
| v^2 (m/s) | 0,61189905 | 0,305949 | 0,048951924 | 0,030594953 | 0,12237981 |
| $2 \cdot g$ (m^2/s) | 19,62 | 19,62 | 19,62 | 19,62 | 19,62 |
| h_{acc} (m) | 1,12275055 | 2,105157 | 0,099800049 | 0,015593758 | 0,561375276 |

Tabla 23- Pérdida de carga en accesorios

Con esto, se puede calcular la pérdida de carga total como la suma de la pérdida de carga en tuberías y la pérdida de carga en accesorios:

| | Circuito 1 | Circuito 2 | Circuito 3 | Circuito 4 | Circuito 5 |
|-------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| $h_{f,total}$ (m) | 1,20957397 | 2,159619244 | 0,101713206 | 0,015969832 | 0,564904587 |

Tabla 24- Pérdida de carga total en cada circuito

Para el caso de los gases se comprueba que la pérdida de carga es completamente despreciable, como era de prever:

| | Circuito 1 | Circuito 2 | Circuito 3 |
|---------------------|-------------|------------|------------|
| P_1 (bar) | 8 | 8 | 8 |
| ρ (kg/m^3) | 1,225 | 1,225 | 1,225 |
| L (m) | 12.5 | 16.25 | 5 |
| D (mm) | 8,2 | 8,2 | 8,2 |
| Q (m^3/h) | 2,72222E-05 | 2,722E-05 | 2,7222E-05 |
| P_2 (bar) | 8 | 8 | 8 |

Tabla 25- Pérdida de carga en la conducción de gases

Se observa que la presión de salida es muy superior a la mínima requerida, de manera que la corriente gaseosa no tendrá problema en entrar en los equipos para su agitación.

9.6.5- Potencia de bomba necesaria

En la siguiente tabla se representa la carga que ha de aportar cada bomba y la potencia necesaria para ello, aplicando las ecuaciones del anexo XX. Se ha estimado un rendimiento del 85%, que es el que estiman los fabricantes de bombas.

| | Bombas centrífugas | | Bombas peristálticas | | |
|-------------------|--------------------|------------|----------------------|------------|---------------------|
| | Modelo Niza 4.4 | | Modelo Peribest I12 | | Modelo Peribest I17 |
| | Circuito 1 | Circuito 2 | Circuito 3 | Circuito 4 | Circuito 5 |
| $P_2 (Pa)$ | 101325 | 101325 | 101325 | 101325 | 101325 |
| $P_1 (Pa)$ | 117954,137 | 105237,738 | 107194,107 | 120886,14 | 101325 |
| $\rho (kg/m^3)$ | 997,13 | 997,13 | 997,13 | 997,13 | 997,13 |
| $g (m/s^2)$ | 9,81 | 9,81 | 9,81 | 9,81 | 9,81 |
| $z_2 (m)$ | 1,8 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 1 |
| $z_1 (m)$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| $h_{f,total} (m)$ | 1,40058548 | 2,25038918 | 0,10425439 | 0,01614101 | 0,581918222 |
| $h_a (m)$ | 1,50058548 | 4,05038918 | 1,70425439 | 0,21640176 | 1,581918222 |
| η | 0,85 | 0,85 | 0,85 | 0,85 | 0,85 |
| $P (W)$ | 11,6495992 | 15,7223335 | 1,05846049 | 0,08400034 | 2,456203067 |

Tabla 26- Potencia de Bomba necesaria

Se comprueba que todas las bombas pueden aportar la carga necesaria para todas las operaciones:

- Las bombas centrífugas, trabajando a su mayor caudal (4800 L/h), pueden aportar una carga de 10 m.
- Las bombas peristálticas pueden aportar una presión máxima de descarga de 10 bares, lo cual es más que suficiente.

9.7- Dimensiones de la planta piloto

La planta piloto provista de los equipos previamente citados se ha considerado que ha de tener unas dimensiones mínimas de 15 x 8 metros, lo que hace un total de 150 m². Además, en el interior de la nave, se dispondrá un laboratorio en el que preparar el medio de cultivo. En dicho laboratorio se encontrarán un espectrofotómetro UV-Vis que permita seguir, a través de medidas de absorbancia, el crecimiento de los cultivos y el arcón congelador para la congelación y el almacenamiento de las muestras. Además, dicho laboratorio tendrá una zona donde se mantengan los cultivos vivos para cuando sea necesario inocular algún fotobiorreactor.

9.8- Planificación

Todos estos equipos y su distribución nos permiten que la planta funcione de manera óptima al tener los procesos completamente secuenciados, disminuyendo los tiempos de espera. De esta manera, se optimiza en tiempo y recursos. La planificación del funcionamiento de la planta, mostrando la secuenciación de las operaciones viene recogida en el siguiente diagrama de Gantt.

| | Nombre | Duración | Inicio | Terminado | Predecesores |
|----|---|----------|----------------|----------------|--------------|
| 1 | Inoculación y crecimiento 1ª Fila Fotobiorreactores | 26 days | 1/08/19 8:00 | 27/08/19 8:00 | |
| 2 | Cosechado y estresado primera fila | 3 days | 27/08/19 8:00 | 30/08/19 8:00 | 1 |
| 3 | Centrifugación y liofilización primera fila | 3 days | 30/08/19 8:00 | 2/09/19 8:00 | 2 |
| 4 | Refrescoado Primera Fila Fotobiorreactores | 17 days | 27/08/19 8:00 | 13/09/19 8:00 | 1 |
| 5 | Inoculación y crecimiento 2ª Fila Fotobiorreactores | 26 days | 5/08/19 8:00 | 31/08/19 8:00 | |
| 6 | Cosechado y estresado segunda fila | 3 days | 31/08/19 8:00 | 3/09/19 8:00 | 5 |
| 7 | Centrifugación y liofilización segunda fila | 3 days | 3/09/19 8:00 | 6/09/19 8:00 | 6 |
| 8 | Refrescoado Sgunda Fila Fotobiorreactores | 17 days | 31/08/19 8:00 | 17/09/19 8:00 | 5 |
| 9 | Inoculación y crecimiento 2ª Fila Fotobiorreactores | 26 days | 8/08/19 8:00 | 3/09/19 8:00 | |
| 10 | Cosechado y estresado tercera Fila | 3 days | 3/09/19 8:00 | 6/09/19 8:00 | 9 |
| 11 | Centrifugación y liofilización tercera fila | 3 days | 6/09/19 8:00 | 9/09/19 8:00 | 10 |
| 12 | Refrescoado Tercera Fila | 17 days | 3/09/19 8:00 | 20/09/19 8:00 | 9 |
| 13 | Inoculación y crecimiento 4ª Fila Fotobiorreactores | 26 days | 13/08/19 10:00 | 8/09/19 10:00 | |
| 14 | Cosechado y estresado cuarta fila | 3 days | 8/09/19 10:00 | 11/09/19 10:00 | 13 |
| 15 | Centrifugación y liofilización cuarta fila | 3 days | 11/09/19 10:00 | 14/09/19 10:00 | 14 |
| 16 | Refrescoado cuarta fila | 17 days | 8/09/19 10:00 | 25/09/19 10:00 | 13 |
| 17 | Cosechado y estresado primera fila | 3 days | 13/09/19 8:00 | 16/09/19 8:00 | 4 |
| 18 | Centrifugación y liofilización primera fila | 3 days | 16/09/19 8:00 | 19/09/19 8:00 | 17 |
| 19 | Refrescoado Primera Fila | 17 days | 13/09/19 8:00 | 30/09/19 8:00 | 4 |
| 20 | Cosechado y estresado segunda fila | 3 days | 17/09/19 8:00 | 20/09/19 8:00 | 8 |
| 21 | Centrifugación y liofilización segunda fila | 3 days | 20/09/19 8:00 | 23/09/19 8:00 | 20 |
| 22 | Refrescoado segunda fila | 17 days | 17/09/19 8:00 | 4/10/19 8:00 | 8 |
| 23 | Cosechado y estresado tercera fila | 3 days | 20/09/19 8:00 | 23/09/19 8:00 | 12 |
| 24 | Centrifugación y liofilización tercera fila | 3 days | 23/09/19 8:00 | 26/09/19 8:00 | 23 |

Figura 31- Diagrama de Gantt del funcionamiento de la planta (Parte 1)

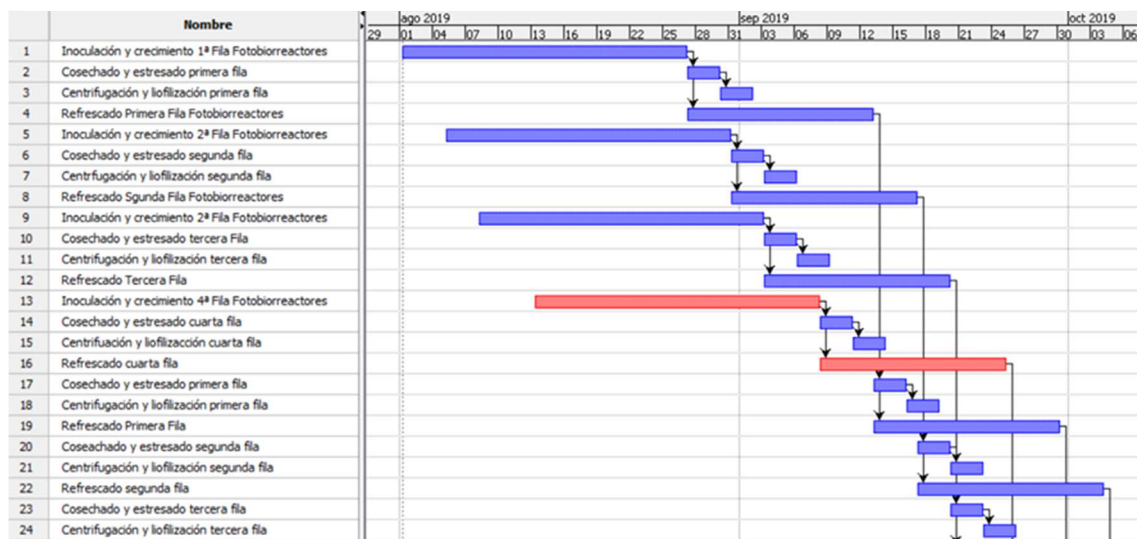


Figura 32- Diagrama de Gantt del funcionamiento de la planta (Parte 2)

Dicha planificación y organización parte de la base de que las 4 filas en las que se organizan los fotobiorreactores para el crecimiento celular no son inoculados o refrescados al mismo tiempo, sino que se realiza con 4 días de diferencia. El día 0 se inocularán los 10 fotobiorreactores de la primera fila, el día 4 será el turno de los 9 de la segunda fila, el día 8 los de la tercera fila, y así, sucesivamente.

De esta manera, el cosechado de los fotobiorreactores no se realizará al mismo tiempo, sino también con 4 días de diferencia, presuponiendo que, al verse todos los reactores sometidos a las mismas condiciones, la velocidad de crecimiento será la misma. Así, el cosechado de la segunda fila de reactores será 4 días después del cosechado de la primera, el cosechado de la tercera otros 4 días después del de la segunda, etc.

Debido a esta secuenciación, cuando finalice el proceso de estresado del cultivo que creció en la primera fila de biorreactores (estresado de tres días de duración), estos equipos estarán disponibles para cuando sea el turno del estresado del cultivo que se encuentra creciendo en la segunda fila de reactores. Y de igual manera, cuando finalice este ciclo de estresado, los reactores estarán disponibles para el estresado del cultivo que está en la tercera fila de fotobiorreactores. Esta organización se irá repitiendo cíclicamente.

Por último, durante esos 4 días de diferencia entre que finalizan dos ciclos de estresado consecutivo, se procederá a la centrifugación y liofilización para obtener la biomasa seca. Así, quedan todas las etapas del proceso de producción perfectamente coordinadas las unas con las otras.

9.9- Optimización y mejoras del proceso

En el diseño del proceso se ha procurado optimizar al máximo los recursos necesarios: bombas, fotobiorreactores, etc. con el fin de hacer el proceso lo más eficiente posible.

Bien es sabido que el número de reactores es muy elevado, más aún cuando se persigue una producción a escala de planta piloto y no a escala industrial. Sin embargo, se ha optado por este tipo de reactores con el fin de variar lo menos posible las condiciones a las que se ha visto sometida *Anabaena sp.*, durante la fase de laboratorio.

De hecho, aunque otros géneros de cianobacterias, tales como *Spirulina sp.*, sí son cultivados a gran escala en reactores tubulares, de este género que nos concierne, apenas hay nada estudiado acerca de su producción a gran escala. Y, aunque puede presuponerse que dos géneros de cianobacterias deben comportarse de igual o de muy similar manera al escalado, bien es cierto que metabólicamente son muy diferentes. Por ejemplo, *Spirulina sp.*, apenas produce MAAs.

Por ello, la incertidumbre en lo que concierne al comportamiento de *Anabaena sp.*, es lo que ha hecho que me decante por este tipo de fotobiorreactores que, aunque son menos eficientes, hay más seguridad de conseguir el fin deseado en este caso.

Por otro lado, se ha obtenido una productividad muy baja por parte de *Anabaena sp.* durante la fase experimental de laboratorio, lo cual puede estar relacionado con los siguientes dos motivos:

- Se ha observado que *Anabaena sp.* de agua marina experimenta una gran fotoinhibición, pudiendo este hecho afectar también, aunque en menor medida a la especie continental.
- La fuente de carbono para *Anabaena sp.* es el CO₂, el cual se introduce con la aireación. En el estudio de la cinética, el único CO₂ añadido es el que se encuentra en el aire, en una proporción del 0,035%, pudiendo resultar un porcentaje muy bajo y actuar como reactivo limitante. De esta manera, la cianobacteria también encontraría dificultad para la producción de biomasa.

Por ello, podría estudiarse en futuras investigaciones cómo afecta la luz al cultivo y conocer los niveles de intensidad de radiación adecuados para un crecimiento óptimo. De igual manera, podría estudiarse si la adición de CO₂ complementario al que se encuentra en el aire provoca un aumento en la velocidad de crecimiento.

Para concluir, la centrifugación y la liofilización son procesos empleados también a escala industrial, por lo que un posterior escalamiento del proceso de producción propuesto no supondría inconveniente en estas operaciones de separación. Con esto, el único equipo a diseñar de nuevo de cara a un posible escalamiento son los fotobiorreactores.

Como mejor opción de cara al interés de una producción industrial, el fotobiorreactor que mejor puede ajustarse a la demanda es el tubular. Dicho reactor consta de un airlift en el que se produce la absorción del CO₂ y desorción del O₂ disuelto y demás intercambios de materia y energía, además de múltiples tubos colocados horizontalmente que surgen del citado airlift y permiten trabajar con un elevado volumen de cultivo en poco espacio. Pero como se ha dicho, es una incertidumbre el comportamiento de *Anabaena sp.* en este tipo de biorreactores.

9.10- Aplicación final de los resultados

Todo este proceso de producción se ha realizado con el objetivo de conseguir un protector solar con microalgas como uno de sus componentes principales.

Pese a no haber sido capaz de elaborar un protector solar óptimo desde 0, sí se ha demostrado la eficacia de las microalgas del género *Anabaena sp.* al ser añadidas a protectores solares comerciales, puesto que se ha comprobado que su adición aumenta en más de un 50% el SPF de estos.

Dicho valor ha sido obtenido al añadir un 5% en masa de biomasa microalgal. Esto hace que con la producción anual para la cual ha sido diseñado este proceso de producción (25 kg/año), se consiga aumentar el SPF de 500 kg de protector solar elaborado comercialmente. Sería otra posible continuación del estudio realizado, el ver cómo varía el SPF en función de la cantidad de biomasa añadida a dicho protector, buscando siempre el mejor resultado a nivel económico.

10. Planificación

Para la realización del presente TFG se ha procurado seguir la siguiente planificación:

| | | Nombre | Duración | Inicio | Terminado | Predecesores |
|----|--|--------------------------------|----------|---------------|---------------|--------------|
| 1 | | Búsqueda de información | 81 days | 3/12/18 8:00 | 22/02/19 8:00 | |
| 2 | | Tomas de decisiones | 15 days | 22/02/19 8:00 | 9/03/19 8:00 | 1 |
| 3 | | Fase experimental | 177 days | 10/01/19 8:00 | 6/07/19 8:00 | |
| 4 | | Diagrama del proceso | 7 days | 9/03/19 8:00 | 16/03/19 8:00 | 2 |
| 5 | | Realización de la memoria | 127 days | 9/03/19 8:00 | 14/07/19 8:00 | 2 |
| 6 | | Antecedentes | 30 days | 9/03/19 8:00 | 8/04/19 8:00 | 2 |
| 7 | | Alcances y objeto | 5 days | 8/04/19 8:00 | 13/04/19 8:00 | 6 |
| 8 | | Desarrollo experimental | 10 days | 13/04/19 8:00 | 23/04/19 8:00 | 7 |
| 9 | | Conclusiones experimentales | 2 days | 23/04/19 8:00 | 25/04/19 8:00 | 8 |
| 10 | | Requisitos de diseño | 2 days | 25/04/19 8:00 | 27/04/19 8:00 | 9 |
| 11 | | Anexos | 60 days | 27/04/19 8:00 | 26/06/19 8:00 | 10 |
| 12 | | Diseño del proceso | 10 days | 26/06/19 8:00 | 6/07/19 8:00 | 11 |
| 13 | | Realización de los planos | 2 days | 6/07/19 8:00 | 8/07/19 8:00 | 12 |
| 14 | | Presupuesto económico | 6 days | 8/07/19 8:00 | 14/07/19 8:00 | 13 |
| 15 | | Impresión y encuadernado | 1 day | 14/07/19 8:00 | 15/07/19 8:00 | 14 |
| 16 | | Entrega del informe final | 1 day | 15/07/19 8:00 | 16/07/19 8:00 | 15 |
| 17 | | Realización de la presentación | 6 days | 16/07/19 8:00 | 22/07/19 8:00 | 16 |
| 18 | | Defensa del TFG | 1 day | 22/07/19 8:00 | 23/07/19 8:00 | 17 |

Figura 33- Diagrama de Gantt de la planificación del TFG (Parte 1)

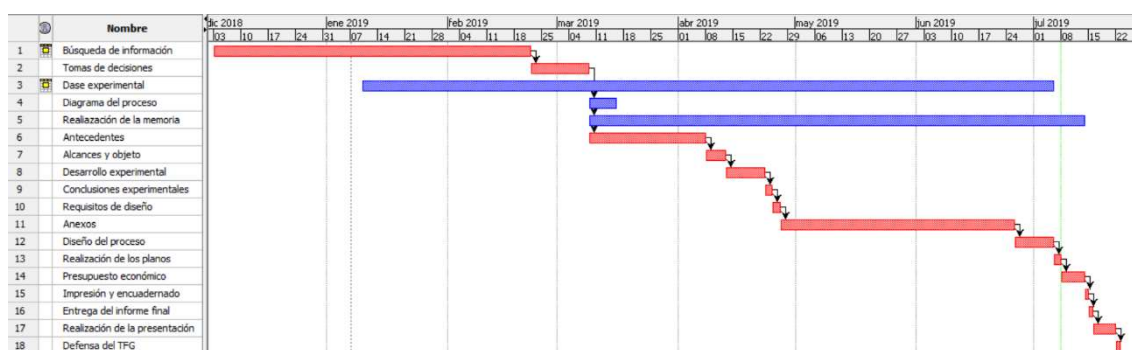


Figura 34- Diagrama de Gantt de la planificación del TFG (Parte 2)

A su vez, para la realización de la fase experimental se han seguido los siguientes pasos, estando la planificación representada en otro diagrama de Gantt:

| | | Nombre | Duración | Inicio | Terminado | Predecesores |
|---|--|--|----------|---------------|---------------|--------------|
| 1 | | Validación del método de determinación del SPF | 14 days | 10/01/19 8:00 | 24/01/19 8:00 | |
| 2 | | Estudio cinética crecimiento Anabaena sp. | 50 days | 10/01/19 8:00 | 1/03/19 8:00 | |
| 3 | | Estresado de microalgas | 100 days | 1/03/19 8:00 | 9/06/19 8:00 | 2 |
| 4 | | Extracción MAAs | 120 days | 1/03/19 8:00 | 29/06/19 8:00 | 2 |
| 5 | | Determinación del SPF de protectores comerciales | 60 days | 24/01/19 8:00 | 25/03/19 8:00 | 1 |
| 6 | | Elaboración del protector solar con microalgas | 6 days | 29/06/19 8:00 | 5/07/19 8:00 | 4;5 |

Figura 35- Diagrama de Gantt de la planificación de la fase experimental (Parte 1)

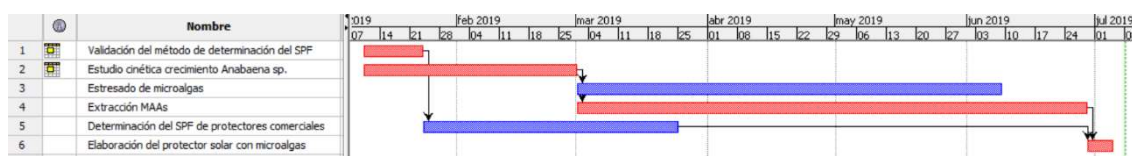


Figura 36- Diagrama de Gantt de la planificación de la fase experimental (Parte 2)

11. Normas y referencias

La bibliografía empleada es la siguiente:

- ACNielsen Global Services, 2007. What's Hot around the Globe: Insights on Personal Care Products.
- Baker, L.A., Marchetti, B., Karsili, T., Stavros, V.G., Ashfold, M., 2017. Chem. Soc. Rev. 46, 3770–3791.
- Bandaranayake, W.M., 1998. Mycosporines: are they nature's sunscreens? Nat. Prod. Rep. 15, 159–172.
- Binks, B.P.; Fletcher, P.D.I.; Johnson, A.J.; Marinopoulos, I.; Crowther, J.; Thompson, M.A., 2017. How the sun protection factor (SPF) of sunscreen films change during solar irradiation. J. Photochem. Photobiol. A Chem. 333, 186–199.
- Blair, B.D., Crago, J.P., Hedman, C.J., Klaper, R.D., 2013a. Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern. Chemosphere 93:2116–2123.
- Blumthaler, M., Ambach, W., Rehwald, W., 1992. Theor. Appl. Climatol. 46, 39–44.
- Bo, L., Shengen, Z., Chang, C.-C., 2016. Emerging pollutants-part II: treatment. Water Environ. Res. 88, 1876–1904.
- Boyer, S.L., Fletcher, V.R., Johansen, J.R., 2001. Is the 16S-23S internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. Molecular Biology and Evolution 18, 1057–1069. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003877>.
- Brausch, J.M., Rand, G.M., 2011. A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. Chemosphere 82:1518–1532. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.018>.
- Cabeza, Y., Candela, L., Ronen, D., Teijon, G., 2012. Monitoring the occurrence of emerging contaminants in treated wastewater and groundwater between 2008 and 2010. The Baix Llobregat (Barcelona, Spain). J. Hazard. Mater. 239–240:32–39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.07.032>.
- Carroll, A.K., Shick, J.M., 1996. Dietary accumulation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids (MAAs) by the green sea urchin (*Stongylocentrotus droebachiensis*). Mar. Biol. 124, 561–569.
- Cheewinthanrongrod, V., Kageyama, H., Palaga, T., Takabe, T., Waditee-Sirisattha, R., Dunlap, W.C., Chalker, B.E., 1986. Coral Reefs. 5, 155–159.
- Contreras, C., na, J. M. P., Flores, L. B., and nizaras, R. O. C. (2003). Avances en el dise~no conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. Interciencia, 28:450-457.
- Corada-Fernández, C., Jiménez-Martínez, J., Candela, L., González-Mazo, E., Lara-Martín, P.A., 2015. Occurrence and spatial distribution of emerging contaminants in the unsaturated zone. Case study: Guadalete River basin (Cadiz, Spain). Chemosphere 119: S131–S137 (Supplement). [10.1016/j.chemosphere.2014.04.098](http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.098).
- De la Coba, F., Aguilera, J., de Gálvez, M.V., Álvarez, M., Gallego, E., Figueroa, F.L., Herrera, E., 2009. Prevention of the ultraviolet effects on clinical and histopathological changes, as well as the heat shock protein-70 expression in mouse skin by topical application of algal UV-absorbing compounds. J. Dermatol. Sci. 55, 161–169.
- Del Río, E., Acien, G., García-Malea, G., Rivas, J., Molina-Grima, E., Guerrero, M.G., 2007. Efficiency assessment of the one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis*. Biotechnology and Bioengineering 74, 397-402.

- Desikachary, T.V., 1959. Cyanophyta. ICAR Monograph on Algae. ICAR, New Delhi, India 686pp.
- Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2009. Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV-absorbing compounds in aquatic ecosystems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28: 708–717. doi:10.1016/j.trac.2009.03.010.
- Diffey, B.L., Robson, J., 1989. A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 40, 127–133.
- Diffey, B.L., Tanner, P.R., Matts, P.J., Nash, F.J., 2000. In vitro assessment of the broad- spectrum ultraviolet protection of sunscreen products, *J. Am. Acad. Dermatol.* 43, 1024–1035.
- Doran, P. M. (1998). Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia S.A.
- Dunlap, W.C., Chalker, B.E., 1986. *Coral Reefs*. 5 (1986) 155–159.
- Ehling-Schulz, M., Scherer, S., 1999. *Eur. J. Phycol.* 34, 329–338.
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D., Jurtshuk Jr., P., 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 166–170.
- Freire, C., Molina-Molina, J. M., Iribarne-Durán, L. M., Jiménez-Díaz, I., Vela-Soria, F., Mustieles, V., ... Olea, N., 2019. Concentrations of bisphenol A and parabens in socks for infants and young children in Spain and their hormone-like activities. *Environment International*. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.013>
- Gao, Q., García-Pichel, F., 2011. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 791–802.
- García-Pichel, F., Castenholz, R.W., 1993. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 163–169.
- Giokas, D.L., Salvador, A., Chisvert, A., 2007. UV filters: From sunscreens to human body and the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26: 360–374.
- Gröniger, A., Sinha, R.P., Klisch, M., Häder, D.P., 2000. Photoprotective compounds in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae—a database. *J. Photochem. Photobiol., B* 58, 115–122.
- Holick, M.F., 2004. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1678S–1688S.
- Inoue, Y., Hori, H., Sakurai, T., Tokitomo, Y., Saito, J., Misonou, T., 2002. *Opt. Rev.* 9, 75–80.
- Jansen, R., Osterwalder, U., Wang, S.Q., Burnett, M., Lim, H.W., 2013. Photoprotection: Part II. Sunscreen: development, efficacy, and controversies. *J. Am. Acad. Dermatol.* 69, 867.e1–867.e14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2013.08.022>.
- Karsten, U., Lembcke, S., Schumann, R., 2007. The effects of ultraviolet radiation on photosynthetic performance, growth and sunscreen compounds in aeroterrestrial biofilm algae isolated from building facades. *Planta* 225, 991– 1000.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., et al., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211.
- Komárek, J., 2013. Süswasserflora von Mitteleuropa, Bd. 19/3: Cyanoprokaryota 3. Teil 3rd Part: Heterocytous Genera. Springer Spektrum
- Leach, C.M., 1965. *Can. J. Chem.* 54, 185–200.
- Luo, H.P., Al-Dahhan, M.H., 2011. Airlift column photobioreactors for *Porphyridium* sp. culturing: Part I. effects of hydrodynamics and reactor geometry, *Biotechnol. Bioeng.*, 109 (4), 932-941.

- Magi, E., Di Carro, M., 2016. Marine environment pollution: the contribution of mass spectrometry to the study of seawater. *Mass Spectrom. Rev.*
- Malone, C.F.S., Rigonato, J., Laughinghouse IV, H.D., Schmidt, E.C., Bouzon, Z.L., Wilmotte, A., Fiore, M.F., Sant'Anna, C.L., 2015. *Cephalothrix* gen. nov. (cyanobacteria): towards an intraspecific phylogenetic evaluation by multilocus analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65, 2993–3007. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.000369>.
- Martin, F.P.H., 2010. Optimization of photobioreactor for astaxanthin production in *Chlorella zofingiensis*. Tesis de Maestría en Ingeniería. National University of Singapore.
- Moyal, D., Alard, V., Bertin, C., Boyer, F., Brown, M.W., Kolbe, L., Matts, P., Pissavini, M., 2013. The revised COLIPA in vitro UVA method, *Int. J. Cosmet. Sci.* 35, 35–40.4.
- Nakamura, H., Kobayashi, J., Hirata, Y., 1982. Separation of mycosporine-like amino acids in marine organisms using reverse-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 250, 113–118.
- Oren, A., Gunde-Cimerman, N., 2007. *FEMS Microbiol. Lett.* 269, 1–10.
- Osterwalder, U., Herzog, B., 2009. Sun protection factors: world-wide confusion, *Br. J. Dermatol.* 161, 13–24.
- Osterwalder, U., Sohn, M., Herzog, B., 2014. Global state of sunscreens. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 30, 62–80.
- Peck, A.M., 2006. Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices. *Anal Bioanal Chem* 386: 907–939. doi:10.1007/s00216-006-0728-3.
- Quartier, S., Garmyn, M., Becart, S., Goossens, A., 2006. Allergic contact dermatitis to copolymers in cosmetics—case report and review of the literature. *Contact dermatitis* 55: 257–267.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y., 1979. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 1–61.
- Roelandts, Rik, 2008. History of Photoprotection. *Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection, Basic and Clinical Dermatology. Informa Healthcare*, pp. 1–10.
- Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Arbib, Z., Garrido-Pérez, C., Barragán, J., Perales, J., 2013. Performance of a flat panel reactor in the continuous culture of microalgae in urban wastewater: prediction from a batch experiment, *Bioresour. Technol.* 127, 456–63.
- S.P. Singh, M. Klisch, R.P. Sinha, D. H€ader, J. Photochem. Photobiol. B 84, 2008. 1500–1505.
- Salvador, A., Chisvert, A., 2005. Sunscreen analysis: a critical survey on UV filters determination. *Anal. Chim. Acta* 537, 1–14.
- Sánchez-Quiles, D., Tovar-Sánchez, A., 2014. Sunscreens as a source of hydrogen peroxide production in coastal waters. *Environ. Sci. Technol.* 48, 9037–9042. <http://dx.doi.org/10.1021/es5020696>.
- Sánchez-Quiles, D., & Tovar-Sánchez, A., 2015. Are sunscreens a new environmental risk associated with coastal tourism? *Environment International*. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.06.007>
- Santos, A.J.M., Miranda, M.S., Esteves da Silva, J.C.G., 2012. The degradation products of UV filters in aqueous and chlorinated aqueous solutions. *Water Research* 46: 3167–3176. doi:10.1016/j.watres.2012.03.057.
- Santos, A.J.M., Miranda, M.S., Esteves da Silva, J.C.G., 2012. The degradation products of UV filters in aqueous and chlorinated aqueous solutions. *Water Res.* 46, 3167–3176. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.057>.
- Schlumpf, M., Schmid, P., Durrer, S., Conscience, M., Maerker, K., Henseler, M., Gruetter, M., Herzog, I., Reolon, S., Ceccatelli, R., Faass, O., Stutz, E., Jarry, H., Wuttke, W., Lichtensteiger, W., 2004. *Toxicology* 205, 113–122.
- Schmalwieser, A.W., Wallisch, S., Diffey, B., 2012. A library of action spectra for erythema and pigmentation, *Photochem. Photobiol. Sci.* 11, 251–268.
- Schmid, D., Schurch, C., Zulli, F., 2006. Mycosporine-like amino acids from red algae protect against premature skin-aging. *Euro Cosmetics* 9, 1–4.
- Shibata, K., 1969. *Plant Cell Physiol.* 10, 97–111.
- Shick, J.M., Dunlap, W.C., 2002. Mycosporine-like amino acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 223–262.
- Shick, J.M., Dunlap, W.C., Chalker, B.E., Banaszak, A.T., Rosenzweig, T.K., 1992. Survey of ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in organs of coral reef holothuroids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 90, 139–148.
- Singh, S.P., Klisch, M., Sinha, R.P., H€ader, D., 2008. *J. Photochem. Photobiol. B* 84, 1500–1505.
- Singh, Y., Khattar, J.I.S., Singh, D.P., Rahi, P., Gulati, A., Biosci. J., 2014. 39, 643–657.
- Sinha, R.P., Ambasht, N.K., Sinha, J.P., H€ader, D., 2003. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2, 171–176.
- Sinha, R.P., H€ader, D., 2008. *Plant Sci.* 174, 278–289.

- Sonntag, B., Kammerlander, B., Summerera, M., 2009. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7017–7025.
- Stochaj, W.R., Dunlap, W.C., Shick, J.M., 1994. Two new UV-absorbing mycosporine-like amino acids from the sea anemone *Anthopleura elegantissima* and the effects of zooxanthellae and spectral irradiance on chemical composition and content. Mar. Biol. 118, 149–156.
- Tønning, K., Jacobsen, E., Pedersen, E., 2009. Survey and Health Assessment of the exposure of 2 year-olds to chemical substances in Consumer Products. Danish Ministry of the Environment. 327 p.
- Tovar-Sánchez, A., Sánchez-Quiles, D., Basterretxea, G., Benedé, J.L., Chisvert, A., Salvador, A., Moreno-Garrido, I., Blasco, J., 2013. Sunscreen products as emerging pollutants to coastal waters. PLoS ONE 8, e65451.
- UNEP, 2009. Sustainable Coastal Tourism - An Integrated Planning and Management Approach. ISBN: 978-92-807-2966-5. 133 p.
- Ugwu, C.U., Aoyagi, H., 2008. Photobioreactors from mass cultivation of algae. Bioresource Technology 99, 4021-4018
- Urbach, F., 2001. The historical aspects of sunscreens. J. Photochem. Photobiol. B 64, 99–104. [http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00202-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00202-0) (ESP Conference on Photoprotection).
- Verhulst, P.F., 1838. Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. Corr. Math. et Phys. 10:113–121.
- Wada, N., Sakamoto, T., Matsugo, S., 2013. Metabolites 20, 463–483.
- Wang, B., Lan, C. Q., & Horsman, M., 2012. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. Biotechnology advances.
- Weisz, A., Milstein, S.R., Scher, A.L., 2007. 4.2. Colouring Agents in Cosmetic Products (Excluding Hair Dyes): Regulatory Aspects and Analytical Methods. Analysis of cosmetic products: 153.
- Xiong, F.S., Kopecky, J., Nedbal, L., 1999. The occurrence of UV-B absorbing mycosporine-like amino acids in freshwater and terrestrial microalgae (Chlorophyta). Aquat. Bot. 63, 37–49.

La webgrafía empleada es la siguiente:

- <https://www.ocu.org/organizacion/prensa/notas-de-rensa/2019/cremasolares300519>
- <https://www.elmundo.es/elmundo/2013/07/16/baleares/1373961581.html>
- re.jrc.ec.europa.eu (Photovoltaic geographical information system, European Commission)
- <https://oceanoptics.com/spf-sun-protection-factor-sunscreen/>
- www.awwa.org/publications/standards
- <https://www.donaldson.com/es-mx/compressed-air-process/technical-articles/sterile-air-what-it-is-why-it-matters/>

Las fuentes de las imágenes obtenidas en la red son:

- Imagen 1: <http://www.unamglobal.unam.mx/?p=36255>
- Imagen 2: <https://miseptiembre.rojo.wordpress.com/2018/01/29/espectroscopia-uv-visible-uv-vis/>
- Imagen 3: <https://www.zamora24horas.com/texto-diario/mostrars/1438026/ocu-pide-retirada-protectores-solares-factor-proteccion-15-pesar-estar-etiquetados-como-spf-50->
- Imagen 4: Sánchez-Quiles, D., Tovar-Sánchez, A., 2015. Are sunscreens a new environmental risk associated with coastal tourism? Environment International. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.06.007>
- Imagen 5: <https://www.flickr.com/photos/microagua/4453861827>
- Imagen 6: <https://patents.google.com/patent/WO2007026037A2/es>

La normativa que se ha tenido en cuenta es:

- Council Directive 76/768/EEC of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products (1976) and its successive amendments and adaptations. Official Journal L 262, 27/09/1976 P 0169– 0200.
- ISO 24443:2012. Determinación in vitro de la fotoprotección UVA. ISO 24443:2012
- REGLAMENTO (CE) No 1223/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 30 de noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos
- Standardisation mandate assigned to CEN concerning methods for testing efficacy of sunscreen products; M/389; European Commission
- UNE-EN 16344 (2014): Cosméticos. Análisis de productos cosméticos. Determinación cualitativa de filtros UV en productos cosméticos y determinación cuantitativa de 10 filtros UV mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- WO 2012/093388 A2

Los programas de ordenador empleados son:

- Microsoft Word 2013: procesador de textos
- Microsoft Excel 2013: para la realización de gráficas y tablas
- Autocad Autodesk: realización de planos.
- OriginPro 2018: cálculo de áreas e integrales

Catálogos:

- Peribest Pumps, 2019.
- Philips Lighting, UV-B Narrowband PLL/PL-S.
- Alfa Laval, 2019.
- Polaris Scientific UV
- Cevik Pro, 2019.
- Catálogo Liofilizadores Laboratorio CoolVacuum 2019 ES
- Bombas Hasa Catálogo, 2019
-

DOCUMENTO II: ANEXOS

Anexo I- Valores de transmitancia de protectores solares en el rango 290-400 nm

Se representan los valores de transmitancia, en tanto %, para cada longitud de onda, de nanómetro en nanómetro, de los diferentes protectores solares comerciales de los que se determinó el SPF y del diseño realizado con la adición de biomasa al protector solar comercial.

| Longitud de onda | Nivea Sun Kids | Avene | Nivea | Babaria Kids | Aptonia | CienSun | CienSun con Biomasa |
|------------------|----------------|--------|--------|--------------|---------|---------|---------------------|
| 290 | 1,9858 | 0,3604 | 4,9721 | 3,5264 | 6,7711 | 5,0345 | 2,1216 |
| 291 | 1,8982 | 0,3502 | 4,8582 | 3,3822 | 6,6376 | 4,9386 | 2,0684 |
| 292 | 1,8263 | 0,3336 | 4,7427 | 3,2393 | 6,4547 | 4,8617 | 2,0351 |
| 293 | 1,7523 | 0,3240 | 4,6245 | 3,1061 | 6,2873 | 4,7742 | 1,9851 |
| 294 | 1,6850 | 0,3122 | 4,5127 | 2,9845 | 6,1271 | 4,7005 | 1,9674 |
| 295 | 1,6091 | 0,3040 | 4,4471 | 2,8594 | 6,0288 | 4,6124 | 1,9366 |
| 296 | 1,5565 | 0,2943 | 4,3462 | 2,7451 | 5,8737 | 4,5296 | 1,8955 |
| 297 | 1,4978 | 0,2888 | 4,2401 | 2,6422 | 5,7365 | 4,4621 | 1,8758 |
| 298 | 1,4465 | 0,2809 | 4,1702 | 2,5545 | 5,6110 | 4,3850 | 1,8515 |
| 299 | 1,4000 | 0,2714 | 4,0649 | 2,4631 | 5,4869 | 4,2909 | 1,8282 |
| 300 | 1,3578 | 0,2684 | 4,0000 | 2,3932 | 5,4048 | 4,2107 | 1,8039 |
| 301 | 1,3118 | 0,2614 | 3,8790 | 2,3235 | 5,2666 | 4,1147 | 1,7851 |
| 302 | 1,2806 | 0,2566 | 3,7813 | 2,2631 | 5,1402 | 4,0356 | 1,7638 |
| 303 | 1,2431 | 0,2525 | 3,7387 | 2,2111 | 5,0688 | 3,9670 | 1,7436 |
| 304 | 1,2127 | 0,2451 | 3,6785 | 2,1670 | 4,9929 | 3,9087 | 1,7199 |
| 305 | 1,1857 | 0,2407 | 3,6154 | 2,1267 | 4,8919 | 3,8571 | 1,6957 |
| 306 | 1,1559 | 0,2358 | 3,5406 | 2,0910 | 4,7987 | 3,8010 | 1,6770 |
| 307 | 1,1234 | 0,2316 | 3,4825 | 2,0633 | 4,7414 | 3,7177 | 1,6569 |
| 308 | 1,1002 | 0,2251 | 3,3604 | 2,0459 | 4,6254 | 3,6207 | 1,6329 |
| 309 | 1,0766 | 0,2217 | 3,2539 | 2,0238 | 4,5519 | 3,5158 | 1,6224 |
| 310 | 1,0575 | 0,2133 | 3,1517 | 2,0165 | 4,4746 | 3,3945 | 1,5890 |
| 311 | 1,0392 | 0,2100 | 3,0516 | 2,0138 | 4,4137 | 3,2820 | 1,5706 |
| 312 | 1,0338 | 0,2089 | 2,9387 | 2,0152 | 4,3308 | 3,1758 | 1,5555 |
| 313 | 1,0165 | 0,2042 | 2,8332 | 2,0343 | 4,2570 | 3,0727 | 1,5442 |
| 314 | 1,0101 | 0,1960 | 2,7089 | 2,0542 | 4,1608 | 2,9756 | 1,5205 |
| 315 | 1,0021 | 0,1947 | 2,6298 | 2,0797 | 4,1255 | 2,8690 | 1,5125 |
| 316 | 0,9917 | 0,1883 | 2,5435 | 2,1215 | 4,0702 | 2,7748 | 1,4938 |
| 317 | 0,9917 | 0,1857 | 2,4773 | 2,1749 | 4,0454 | 2,6903 | 1,4782 |
| 318 | 0,9888 | 0,1816 | 2,4327 | 2,2391 | 4,0363 | 2,6308 | 1,4612 |
| 319 | 0,9985 | 0,1803 | 2,3918 | 2,3289 | 4,0198 | 2,5921 | 1,4597 |
| 320 | 0,9974 | 0,1760 | 2,3674 | 2,4244 | 4,0491 | 2,5369 | 1,4527 |
| 321 | 1,0045 | 0,1722 | 2,2899 | 2,5263 | 4,0177 | 2,4589 | 1,4384 |
| 322 | 1,0098 | 0,1675 | 2,1996 | 2,6571 | 4,0343 | 2,3463 | 1,4197 |

| | | | | | | | |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 323 | 1,0271 | 0,1628 | 2,0648 | 2,7948 | 4,0019 | 2,2129 | 1,4088 |
| 324 | 1,0430 | 0,1582 | 1,9389 | 2,9360 | 3,9893 | 2,0613 | 1,3859 |
| 325 | 1,0670 | 0,1567 | 1,7888 | 3,1023 | 3,9688 | 1,8836 | 1,3734 |
| 326 | 1,0968 | 0,1512 | 1,6345 | 3,2542 | 3,9417 | 1,6948 | 1,3550 |
| 327 | 1,1277 | 0,1461 | 1,4777 | 3,4060 | 3,8686 | 1,5019 | 1,3320 |
| 328 | 1,1627 | 0,1435 | 1,3519 | 3,5546 | 3,7933 | 1,3230 | 1,3216 |
| 329 | 1,1996 | 0,1398 | 1,2516 | 3,6842 | 3,7361 | 1,1595 | 1,3188 |
| 330 | 1,2273 | 0,1331 | 1,1678 | 3,8136 | 3,6666 | 1,0242 | 1,2994 |
| 331 | 1,2567 | 0,1285 | 1,1032 | 3,9124 | 3,5731 | 0,9049 | 1,3050 |
| 332 | 1,2799 | 0,1242 | 1,0560 | 3,9860 | 3,5102 | 0,8160 | 1,3044 |
| 333 | 1,2996 | 0,1190 | 1,0128 | 4,0559 | 3,4276 | 0,7440 | 1,2990 |
| 334 | 1,3065 | 0,1138 | 0,9818 | 4,1026 | 3,3638 | 0,6912 | 1,3041 |
| 335 | 1,3019 | 0,1103 | 0,9528 | 4,1280 | 3,2839 | 0,6520 | 1,2981 |
| 336 | 1,3000 | 0,1059 | 0,9066 | 4,1369 | 3,1509 | 0,6224 | 1,2974 |
| 337 | 1,2872 | 0,1005 | 0,8858 | 4,1322 | 3,1062 | 0,5924 | 1,2905 |
| 338 | 1,2703 | 0,0964 | 0,8584 | 4,1211 | 3,0226 | 0,5746 | 1,2861 |
| 339 | 1,2484 | 0,0955 | 0,8328 | 4,0970 | 2,9578 | 0,5555 | 1,2822 |
| 340 | 1,2290 | 0,0933 | 0,8112 | 4,0754 | 2,8783 | 0,5413 | 1,2814 |
| 341 | 1,2086 | 0,0890 | 0,7830 | 4,0496 | 2,8063 | 0,5280 | 1,2823 |
| 342 | 1,1897 | 0,0871 | 0,7616 | 4,0252 | 2,7449 | 0,5182 | 1,2715 |
| 343 | 1,1685 | 0,0842 | 0,7387 | 3,9893 | 2,6905 | 0,5111 | 1,2678 |
| 344 | 1,1515 | 0,0824 | 0,7261 | 3,9701 | 2,6446 | 0,5007 | 1,2617 |
| 345 | 1,1293 | 0,0821 | 0,7031 | 3,9352 | 2,5856 | 0,4934 | 1,2592 |
| 346 | 1,1206 | 0,0795 | 0,6924 | 3,9180 | 2,5501 | 0,4886 | 1,2644 |
| 347 | 1,1080 | 0,0796 | 0,6840 | 3,9027 | 2,5157 | 0,4831 | 1,2601 |
| 348 | 1,0994 | 0,0796 | 0,6751 | 3,9050 | 2,4915 | 0,4782 | 1,2573 |
| 349 | 1,0862 | 0,0743 | 0,6626 | 3,8884 | 2,4650 | 0,4698 | 1,2477 |
| 350 | 1,0735 | 0,0787 | 0,6899 | 3,7623 | 2,3497 | 0,4979 | 1,2748 |
| 351 | 1,0667 | 0,0770 | 0,6809 | 3,7597 | 2,3448 | 0,4942 | 1,2765 |
| 352 | 1,0607 | 0,0760 | 0,6783 | 3,7517 | 2,3391 | 0,4943 | 1,2719 |
| 353 | 1,0540 | 0,0743 | 0,6701 | 3,7542 | 2,3352 | 0,4918 | 1,2689 |
| 354 | 1,0499 | 0,0754 | 0,6659 | 3,7489 | 2,3341 | 0,4888 | 1,2684 |
| 355 | 1,0451 | 0,0751 | 0,6591 | 3,7482 | 2,3434 | 0,4888 | 1,2691 |
| 356 | 1,0437 | 0,0753 | 0,6566 | 3,7497 | 2,3598 | 0,4849 | 1,2646 |
| 357 | 1,0442 | 0,0746 | 0,6548 | 3,7492 | 2,3719 | 0,4855 | 1,2662 |
| 358 | 1,0446 | 0,0757 | 0,6558 | 3,7611 | 2,3928 | 0,4861 | 1,2647 |
| 359 | 1,0502 | 0,0750 | 0,6558 | 3,7808 | 2,4222 | 0,4877 | 1,2624 |
| 360 | 1,0596 | 0,0769 | 0,6626 | 3,8155 | 2,4569 | 0,4913 | 1,2640 |
| 361 | 1,0828 | 0,0784 | 0,6713 | 3,8606 | 2,5050 | 0,4980 | 1,2693 |
| 362 | 1,1083 | 0,0800 | 0,6866 | 3,9337 | 2,5611 | 0,5104 | 1,2711 |
| 363 | 1,1476 | 0,0825 | 0,7061 | 4,0296 | 2,6340 | 0,5241 | 1,2790 |
| 364 | 1,1995 | 0,0851 | 0,7337 | 4,1455 | 2,7194 | 0,5428 | 1,2871 |
| 365 | 1,2621 | 0,0897 | 0,7662 | 4,2902 | 2,8180 | 0,5657 | 1,3014 |
| 366 | 1,3374 | 0,0956 | 0,8049 | 4,4665 | 2,9314 | 0,5942 | 1,3144 |
| 367 | 1,4246 | 0,1023 | 0,8474 | 4,6548 | 3,0542 | 0,6268 | 1,3308 |
| 368 | 1,5250 | 0,1102 | 0,8996 | 4,8699 | 3,1833 | 0,6625 | 1,3523 |

| | | | | | | | |
|-----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 369 | 1,6326 | 0,1183 | 0,9512 | 5,0894 | 3,3228 | 0,6982 | 1,3731 |
| 370 | 1,7392 | 0,1283 | 1,0030 | 5,3150 | 3,4506 | 0,7365 | 1,3946 |
| 371 | 1,8515 | 0,1407 | 1,0567 | 5,5461 | 3,5832 | 0,7723 | 1,4183 |
| 372 | 1,9621 | 0,1545 | 1,1095 | 5,7748 | 3,7105 | 0,8076 | 1,4367 |
| 373 | 2,0709 | 0,1678 | 1,1612 | 5,9932 | 3,8323 | 0,8405 | 1,4555 |
| 374 | 2,1777 | 0,1841 | 1,2116 | 6,2136 | 3,9508 | 0,8730 | 1,4759 |
| 375 | 2,2832 | 0,2020 | 1,2621 | 6,4200 | 4,0702 | 0,9016 | 1,4950 |
| 376 | 2,3912 | 0,2221 | 1,3148 | 6,6391 | 4,1879 | 0,9310 | 1,5136 |
| 377 | 2,5041 | 0,2463 | 1,3734 | 6,8664 | 4,3187 | 0,9638 | 1,5344 |
| 378 | 2,6304 | 0,2732 | 1,4368 | 7,1096 | 4,4499 | 1,0000 | 1,5551 |
| 379 | 2,7801 | 0,3051 | 1,5151 | 7,3925 | 4,6101 | 1,0430 | 1,5842 |
| 380 | 2,9702 | 0,3492 | 1,6163 | 7,7296 | 4,8048 | 1,1046 | 1,6221 |
| 381 | 3,2191 | 0,4059 | 1,7500 | 8,1555 | 5,0547 | 1,1913 | 1,6766 |
| 382 | 3,5644 | 0,4832 | 1,9302 | 8,7104 | 5,3674 | 1,3168 | 1,7501 |
| 383 | 4,0223 | 0,5937 | 2,1774 | 9,4121 | 5,7741 | 1,4919 | 1,8593 |
| 384 | 4,6489 | 0,7470 | 2,5007 | 10,2978 | 6,2656 | 1,7391 | 2,0109 |
| 385 | 5,4796 | 0,9635 | 2,9277 | 11,3871 | 6,8636 | 2,0841 | 2,2263 |
| 386 | 6,5148 | 1,2505 | 3,4576 | 12,6192 | 7,5283 | 2,5335 | 2,5068 |
| 387 | 7,8421 | 1,6405 | 4,1282 | 14,0411 | 8,2740 | 3,1463 | 2,8912 |
| 388 | 9,4672 | 2,1434 | 4,9432 | 15,5995 | 9,0736 | 3,9598 | 3,4067 |
| 389 | 11,4200 | 2,7881 | 5,9283 | 17,2578 | 9,9165 | 5,0373 | 4,0877 |
| 390 | 13,8005 | 3,5958 | 7,1588 | 19,0527 | 10,8069 | 6,4868 | 5,0083 |
| 391 | 16,5658 | 4,5723 | 8,6570 | 20,9178 | 11,7497 | 8,4092 | 6,2263 |
| 392 | 19,8126 | 5,7532 | 10,4996 | 22,9243 | 12,7865 | 10,9720 | 7,8497 |
| 393 | 23,5653 | 7,1508 | 12,7869 | 25,1039 | 13,9176 | 14,3709 | 9,9748 |
| 394 | 27,6609 | 8,7070 | 15,5510 | 27,4177 | 15,1987 | 18,5407 | 12,5694 |
| 395 | 32,2394 | 10,5096 | 18,8922 | 30,0238 | 16,6888 | 23,7702 | 15,7806 |
| 396 | 37,1825 | 12,4991 | 22,8280 | 32,9408 | 18,4154 | 29,8943 | 19,4980 |
| 397 | 42,1806 | 14,6007 | 27,1837 | 36,0633 | 20,3617 | 36,5782 | 23,5033 |
| 398 | 47,3308 | 16,8628 | 32,0930 | 39,5207 | 22,6522 | 43,7781 | 27,7862 |
| 399 | 52,4038 | 19,2085 | 37,4330 | 43,1557 | 25,3023 | 51,1006 | 32,0628 |
| 400 | 57,2115 | 21,6151 | 42,7855 | 46,9135 | 28,1707 | 58,1728 | 36,1175 |

Tabla A1- Transmitancias de los protectores solares respecto a la longitud de onda

Anexo II- Rectas de calibrado Absorbancia - Concentración

En este anexo se incluyen las tablas con los datos y cálculos para la obtención de las rectas de calibrado para *Anabaena sp.* marina y *Anabaena sp.* continental.

Para *Anabaena sp.* marina:

| <i>Anabaena sp.</i> marina | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------------|------------------------------------|-----------------------------|--------------|--------------|
| Dilución | m _{filtro} (g) | m _{filtro+microalgas} (g) | m _{microalgas} (g) | Volumen (mL) | Factor conv. |
| 100% | 0,1207 | 0,1242 | 0,0035 | 5 | 1000 |
| | 0,1211 | 0,1237 | 0,0026 | 5 | 1000 |
| 75% | 0,1195 | 0,124 | 0,0045 | 10 | 1000 |
| | 0,1204 | 0,1224 | 0,002 | 5 | 1000 |
| 50% | 0,1204 | 0,1237 | 0,0033 | 10 | 1000 |
| | 0,1213 | 0,1247 | 0,0034 | 10 | 1000 |
| 25% | 0,1213 | 0,1235 | 0,0022 | 15 | 1000 |
| | 0,1205 | 0,1229 | 0,0024 | 15 | 1000 |
| 10% | 0,1212 | 0,1223 | 0,0011 | 20 | 1000 |
| | 0,1198 | 0,1209 | 0,0011 | 20 | 1000 |

Tabla A2- Datos para la elaboración de la recta de calibrado de *Anabaena sp.* marina (Parte 1)

| <i>Anabaena sp.</i> marina | | | |
|-----------------------------------|------------------------|-------------|----------------------|
| Concentración (mg/mL) | Promedio Conc. (mg/mL) | Absorbancia | Absorbancia promedio |
| 0,700 | 0,610 | 1,011 | 1,0375 |
| 0,520 | | 1,064 | |
| 0,450 | 0,425 | 0,767 | 0,7635 |
| 0,400 | | 0,760 | |
| 0,330 | 0,335 | 0,546 | 0,5425 |
| 0,340 | | 0,539 | |
| 0,147 | 0,153 | 0,278 | 0,2725 |
| 0,160 | | 0,267 | |
| 0,055 | 0,055 | 0,102 | 0,1035 |
| 0,055 | | 0,105 | |

Tabla A3- Datos para la elaboración de la recta de calibrado de *Anabaena sp.* marina (Parte 2)

Para *Anabaena sp.* continental:

| <i>Anabaena sp.</i> continental | | | | | |
|--|-------------------------|------------------------------------|-----------------------------|--------------|--------------|
| Dilución | m _{filtro} (g) | m _{filtro+microalgas} (g) | m _{microalgas} (g) | Volumen (mL) | Factor conv. |
| 100% | 0,1188 | 0,1216 | 0,0028 | 5 | 1000 |
| | 0,1204 | 0,1232 | 0,0028 | 5 | 1000 |
| 75% | 0,1193 | 0,1214 | 0,0021 | 5 | 1000 |
| | 0,1208 | 0,1225 | 0,0017 | 5 | 1000 |
| 50% | 0,1205 | 0,123 | 0,0025 | 10 | 1000 |
| | 0,1207 | 0,1228 | 0,0021 | 10 | 1000 |
| 25% | 0,1191 | 0,1206 | 0,0015 | 15 | 1000 |
| | 0,1202 | 0,1219 | 0,0017 | 15 | 1000 |
| 10% | 0,1211 | 0,1218 | 0,0007 | 20 | 1000 |
| | 0,121 | 0,1217 | 0,0007 | 20 | 1000 |

Tabla A4- Datos para la elaboración de la recta de calibrado de *Anabaena sp.* continental (Parte 1)

| <i>Anabaena sp.</i> continental | | | |
|--|------------------------|-------------|----------------------|
| Concentración (mg/mL) | Promedio Conc. (mg/mL) | Absorbancia | Absorbancia promedio |
| 0,560 | 0,560 | 1,343 | 1,3465 |
| 0,560 | | 1,350 | |
| 0,420 | 0,380 | 1,017 | 1,02 |
| 0,340 | | 1,023 | |
| 0,250 | 0,230 | 0,678 | 0,679 |
| 0,210 | | 0,680 | |
| 0,100 | 0,107 | 0,329 | 0,3325 |
| 0,113 | | 0,336 | |
| 0,035 | 0,035 | 0,146 | 0,138 |
| 0,035 | | 0,130 | |

Tabla A5- Datos para la elaboración de la recta de calibrado de *Anabaena sp.* continental (Parte 2)

En la tabla que aparece en el apartado 6. *Procedimiento Experimental* de la memoria, aparecen únicamente las columnas de concentración promedio y absorbancia promedio, que son las necesarias para realizar las rectas de calibrado. El procedimiento de cálculo viene explicado también en el citado apartado.

Anexo III- Cinética de Crecimiento

Para la obtención de los parámetros cinéticos se ha empleado el modelo logístico de Verhulst, cuyas ecuaciones aparecen en el apartado 6. *Desarrollo experimental* de la memoria. Se muestran, a continuación, los resultados obtenidos para cada fotobiorreactor, aportando, para ello, una tabla con la concentración y la biomasa, la gráfica de ajuste al modelo, y una tabla con los parámetros obtenidos al aplicar el modelo al crecimiento de cada cultivo.

Para el caso del primer reactor de *Anabaena sp.* marina, AS1, obtenemos:

| REACTOR 1- ANABAENA MARINA | | | | |
|----------------------------|----------|--------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| t (horas) | X (mg/L) | X _{pred} (mg/L) | (X-X _{pred}) ² | (X-X _{av}) ² |
| 0 | 0,33755 | 4,23 | 15,17 | 29130,96 |
| 24 | 7,7593 | 6,18 | 2,49 | 26652,58 |
| 48 | 13,90875 | 9,01 | 24,01 | 24682,52 |
| 72 | 17,30155 | 13,09 | 17,73 | 23627,97 |
| 96 | 24,2992 | 18,95 | 28,67 | 21525,67 |
| 120 | 35,11375 | 27,25 | 61,77 | 18469,28 |
| 144 | 52,2898 | 38,88 | 179,80 | 14095,79 |
| 168 | 63,3164 | 54,83 | 72,05 | 11599,09 |
| 192 | 81,5527 | 76,11 | 29,59 | 8003,59 |
| 216 | 106,1505 | 103,51 | 6,97 | 4207,47 |
| 240 | 132,8688 | 137,18 | 18,55 | 1455,17 |
| 264 | 150,2569 | 176,26 | 676,22 | 430,92 |
| 312 | 240,1661 | 261,79 | 467,73 | 4781,81 |
| 336 | 322,4415 | 302,35 | 403,85 | 22929,84 |
| 360 | 354,249 | 338,05 | 262,48 | 33574,52 |
| 408 | 402,5964 | 390,99 | 134,75 | 53629,72 |
| 432 | 418,2881 | 408,68 | 92,34 | 61143,75 |
| 456 | 409,382 | 421,69 | 151,41 | 56818,60 |
| 480 | 417,0158 | 431,04 | 196,71 | 60516,16 |
| | | Suma | 2842,28 | 477275,40 |

Tabla A6- Datos de concentración de biomasa frente a tiempo del reactor AS1

Las dos primeras columnas hacen referencia a la concentración medida en cada instante de tiempo. La tercera columna corresponde a los dos datos de concentración predichos por el modelo en base a los datos hallados experimentalmente, la cuarta es la diferencia entre el dato predicho por el modelo y el hallado experimentalmente en el laboratorio al cuadrado. La última columna corresponde al cuadrado de la diferencia entre la biomasa real medida experimentalmente y el promedio de dicha biomasa. Con todos estos datos, la aplicación del modelo en la hoja de cálculo Excel nos permite hallar los parámetros de dicho modelo y realizar su representación.

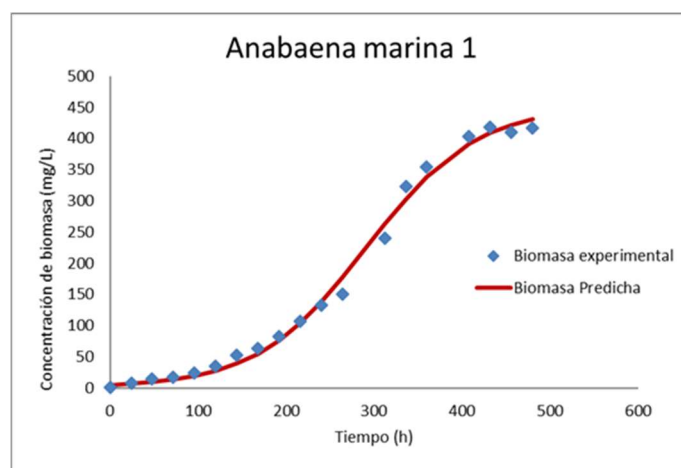


Figura A1- Ajuste del modelo de Verhulst para el biorreactor AS1

| Parámetro | Unidades | Valor |
|-----------|----------------------|---------|
| X_0 | mg/L | 4,2 |
| X_m | mg/L | 452,6 |
| μ | h^{-1} | 0,016 |
| R^2 | | 0.99404 |
| dX/dt | $mg\ L^{-1}\ h^{-1}$ | 0,9 |

Tabla A7- Parámetros cinéticos obtenidos del biorreactor AS1

Para el reactor AS2, se obtienen los siguientes datos:

| REACTOR 2- ANABAENA MARINA | | | | |
|----------------------------|----------|-------------------|------------------|----------------|
| t (horas) | X (mg/L) | X_{pred} (mg/L) | $(X-X_{pred})^2$ | $(X-X_{av})^2$ |
| 0 | 3 | 4,22 | 1,49 | 36764,33 |
| 24 | 6,69905 | 6,29 | 0,17 | 35359,50 |
| 48 | 15,60515 | 9,35 | 39,18 | 32089,39 |
| 72 | 16,02925 | 13,85 | 4,76 | 31937,63 |
| 96 | 14,5449 | 20,42 | 34,57 | 32470,37 |
| 120 | 38,93065 | 29,93 | 81,02 | 24276,64 |

| | | | | |
|-----|----------|-------------|----------------|------------------|
| 144 | 58,2272 | 43,45 | 218,48 | 18635,82 |
| 168 | 73,0707 | 62,24 | 117,35 | 14803,49 |
| 192 | 93,0034 | 87,56 | 29,65 | 10350,39 |
| 216 | 114,6325 | 120,27 | 31,79 | 6417,26 |
| 240 | 146,0159 | 160,32 | 204,48 | 2374,07 |
| 264 | 200,7248 | 206,22 | 30,21 | 35,81 |
| 288 | 249,0722 | 255,05 | 35,71 | 2951,96 |
| 312 | 301,6606 | 303,01 | 1,83 | 11431,95 |
| 336 | 352,1285 | 346,59 | 30,64 | 24771,05 |
| 360 | 394,9626 | 383,46 | 132,20 | 40088,98 |
| 408 | 448,8233 | 435,10 | 188,31 | 64558,18 |
| 432 | 453,0643 | 451,38 | 2,83 | 66731,30 |
| 456 | 451,3679 | 462,97 | 134,53 | 65857,74 |
| 480 | 463,2427 | 471,05 | 60,92 | 72093,55 |
| | | Suma | 1380,13 | 593999,43 |

Tabla A8- Datos de concentración de biomasa frente a tiempo del reactor AS2

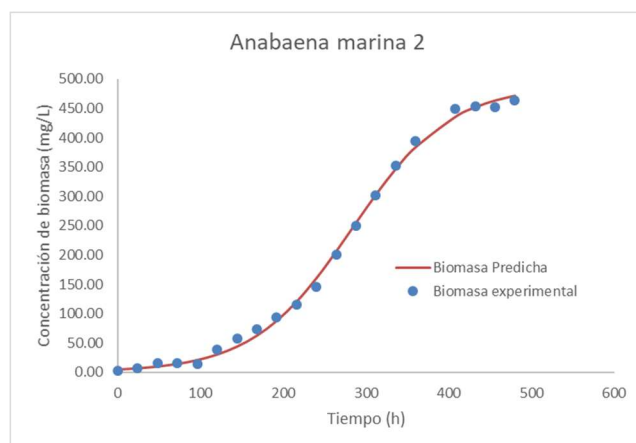


Figura A2- Ajuste del modelo de Verhulst para el biorreactor AS2

| Parámetro | Unidades | Valor |
|-----------|----------------------|---------|
| X_0 | mg/L | 4,2 |
| X_m | mg/L | 488,2 |
| μ | h^{-1} | 0,017 |
| R^2 | | 0,99768 |
| dX/dt | $mg\ L^{-1}\ h^{-1}$ | 1.1 |

Tabla A9- Parámetros cinéticos obtenidos del biorreactor AS2

Para el reactor AS3, los datos obtenidos son:

| REACTOR 3- ANABAENA MARINA | | | | |
|----------------------------|----------|--------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| t (horas) | X (mg/L) | X _{pred} (mg/L) | (X-X _{pred}) ² | (X-X _{av}) ² |
| 0 | 5,42675 | 5,98 | 0,30 | 38337,75 |
| 24 | 12,8485 | 8,93 | 15,32 | 35486,47 |
| 48 | 27,692 | 13,32 | 206,67 | 30114,40 |
| 72 | 27,05585 | 19,76 | 53,30 | 30335,60 |
| 96 | 37,4463 | 29,11 | 69,45 | 26824,13 |
| 120 | 56,31875 | 42,49 | 191,30 | 20998,41 |
| 144 | 68,4056 | 61,16 | 52,44 | 17641,53 |
| 168 | 97,2444 | 86,41 | 117,41 | 10812,39 |
| 192 | 119,7217 | 119,07 | 0,42 | 6643,12 |
| 216 | 146,44 | 159,03 | 158,43 | 3001,62 |
| 240 | 190,9705 | 204,67 | 187,72 | 105,20 |
| 264 | 247,3758 | 252,92 | 30,74 | 2129,71 |
| 288 | 276,2146 | 299,91 | 561,44 | 5623,14 |
| 312 | 339,4055 | 342,16 | 7,58 | 19093,29 |
| 336 | 408,9579 | 377,51 | 989,27 | 43152,12 |
| 360 | 443,7341 | 405,33 | 1474,51 | 58809,68 |
| 408 | 446,7028 | 441,33 | 28,86 | 60258,36 |
| 432 | 430,587 | 451,98 | 457,73 | 52606,00 |
| 456 | 440,7654 | 459,35 | 345,38 | 57378,63 |
| Suma | | | 4948,27 | 519351,53 |

Tabla A10- Datos de concentración de biomasa frente a tiempo del reactor AS3

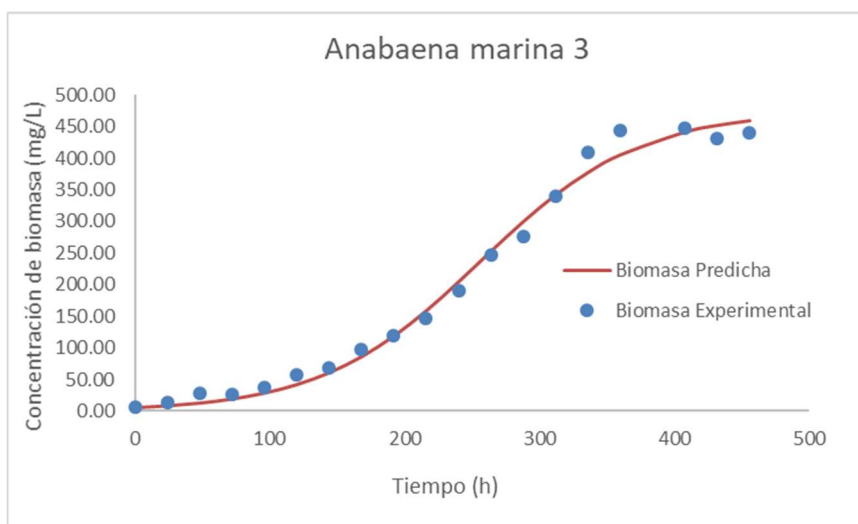


Figura A3- Ajuste del modelo de Verhulst para el biorreactor AS3

| Parámetro | Unidades | Valor |
|-----------|----------------------|---------|
| X_0 | mg/L | 6,0 |
| X_m | mg/L | 474,7 |
| μ | h^{-1} | 0,017 |
| R2 | | 0,99047 |
| dX/dt | $mg\ L^{-1}\ h^{-1}$ | 1,1 |

Tabla A11- Parámetros cinéticos obtenidos del biorreactor AS3

Los datos obtenidos para *Anabaena sp.*, continental en el reactor AD1 son:

| REACTOR 1- ANABAENA CONTINENTAL | | | | |
|---------------------------------|-----------|-------------------|------------------|----------------|
| t (horas) | X (mg/L) | X_{pred} (mg/L) | $(X-X_{pred})^2$ | $(X-X_{av})^2$ |
| 0 | 0,1255 | 77,23 | 5944,52 | 364112,03 |
| 24 | 23,0269 | 90,50 | 4553,17 | 336998,32 |
| 48 | 60,55975 | 105,83 | 2049,20 | 294830,23 |
| 72 | 114,75973 | 123,43 | 75,14 | 238908,56 |
| 96 | 118,8735 | 143,53 | 608,00 | 234904,00 |
| 120 | 132,8688 | 166,35 | 1120,91 | 221533,70 |
| 144 | 157,8907 | 192,06 | 1167,74 | 198605,49 |
| 168 | 205,814 | 220,81 | 224,84 | 158187,93 |
| 192 | 257,1301 | 252,65 | 20,03 | 120001,53 |
| 216 | 294,875 | 287,59 | 53,13 | 95275,60 |
| 240 | 325,8343 | 325,48 | 0,12 | 77121,82 |
| 264 | 368,2443 | 366,12 | 4,53 | 55365,23 |
| 288 | 438,6449 | 409,13 | 871,09 | 27191,21 |
| 312 | 488,6887 | 454,06 | 1199,35 | 13191,39 |
| 336 | 562,9062 | 500,33 | 3916,18 | 1651,31 |
| 360 | 606,5885 | 547,30 | 3515,63 | 9,28 |
| 408 | 682,5024 | 640,59 | 1756,31 | 6234,67 |
| 432 | 680,3819 | 685,59 | 27,14 | 5904,30 |
| 456 | 732,5462 | 728,70 | 14,79 | 16641,96 |
| 480 | 760,9609 | 769,45 | 71,99 | 24780,56 |
| 504 | 813,5493 | 807,47 | 36,97 | 44102,87 |
| 528 | 819,0626 | 842,53 | 550,90 | 46448,93 |
| 576 | 880,9812 | 903,40 | 502,47 | 76972,25 |
| 600 | 899,2175 | 929,24 | 901,45 | 87423,73 |
| 624 | 909,3959 | 952,18 | 1830,73 | 93546,32 |
| 648 | 933,5696 | 972,40 | 1507,86 | 108917,91 |
| 672 | 952,6541 | 990,11 | 1402,63 | 121878,93 |
| 696 | 969,6181 | 1005,52 | 1289,28 | 134011,37 |

| | | | | |
|-----|-----------|-------------|-----------------|-------------------|
| 744 | 984,0375 | 1030,42 | 2151,32 | 144776,47 |
| 768 | 1025,1752 | 1040,34 | 229,87 | 177774,16 |
| 864 | 1053,1658 | 1067,58 | 207,84 | 202161,14 |
| 888 | 1067,5852 | 1072,07 | 20,10 | 215335,66 |
| 912 | 1084,1251 | 1075,88 | 68,06 | 230959,67 |
| 960 | 1115,0844 | 1081,84 | 1105,50 | 261675,15 |
| | | Suma | 38998,79 | 4437433,71 |

Tabla A12- Datos de concentración de biomasa frente a tiempo del reactor AD1

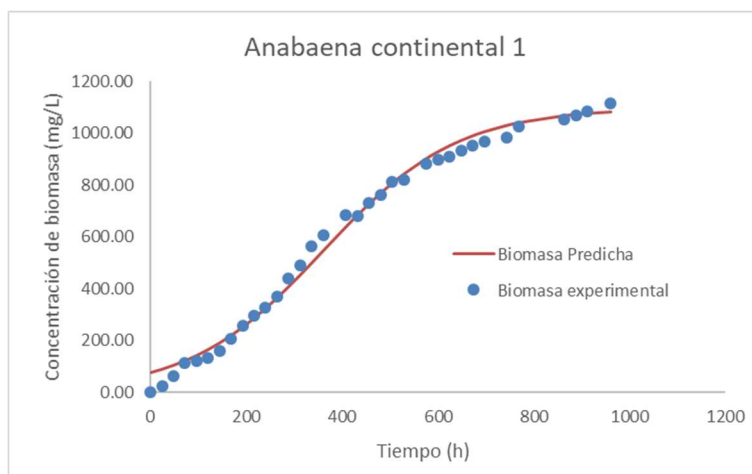


Figura A4- Ajuste del modelo de Verhulst para el biorreactor AD1

| Parámetro | Unidades | Valor |
|-----------|----------------------|---------|
| X_0 | mg/L | 77,2 |
| X_m | mg/L | 1096,7 |
| μ | h^{-1} | 0,007 |
| R2 | | 0,99121 |
| dX/dt | $mg\ L^{-1}\ h^{-1}$ | 1,4 |

Tabla A13- Parámetros cinéticos obtenidos del biorreactor AD1

Para el reactor AD2, los datos obtenidos son:

| REACTOR 2- ANABAENA CONTINENTAL | | | | |
|---------------------------------|----------|-------------------|------------------|----------------|
| t (horas) | X (mg/L) | X_{pred} (mg/L) | $(X-X_{pred})^2$ | $(X-X_{av})^2$ |
| 0 | 4,15445 | 42,76 | 1490,62 | 90980,26 |
| 24 | 17,30155 | 55,37 | 1448,84 | 83222,01 |
| 48 | 51,4416 | 71,28 | 393,40 | 64689,95 |
| 72 | 109,1192 | 91,11 | 324,39 | 38676,96 |
| 96 | 146,44 | 115,44 | 961,06 | 25390,44 |
| 120 | 176,5511 | 144,71 | 1013,72 | 16701,09 |
| 144 | 203,2694 | 179,12 | 583,32 | 10509,20 |
| 168 | 240,1661 | 218,46 | 471,16 | 4305,68 |

| | | | | |
|-----|----------|-------------|-----------------|------------------|
| 192 | 247,7999 | 262,06 | 203,36 | 3362,13 |
| 216 | 280,8797 | 308,73 | 775,87 | 620,21 |
| 240 | 327,9548 | 356,88 | 836,70 | 491,55 |
| 264 | 383,936 | 404,68 | 430,50 | 6107,77 |
| 288 | 442,8859 | 450,38 | 56,19 | 18796,99 |
| 312 | 509,8937 | 492,51 | 302,25 | 41660,85 |
| 336 | 557,3929 | 530,06 | 746,88 | 63307,14 |
| 360 | 591,745 | 562,56 | 851,94 | 81773,81 |
| 408 | 595,986 | 612,54 | 274,18 | 84217,32 |
| 432 | 617,191 | 630,84 | 186,43 | 96974,45 |
| | | Suma | 11350,82 | 731787,83 |

Tabla A14- Datos de concentración de biomasa frente a tiempo del reactor AD2

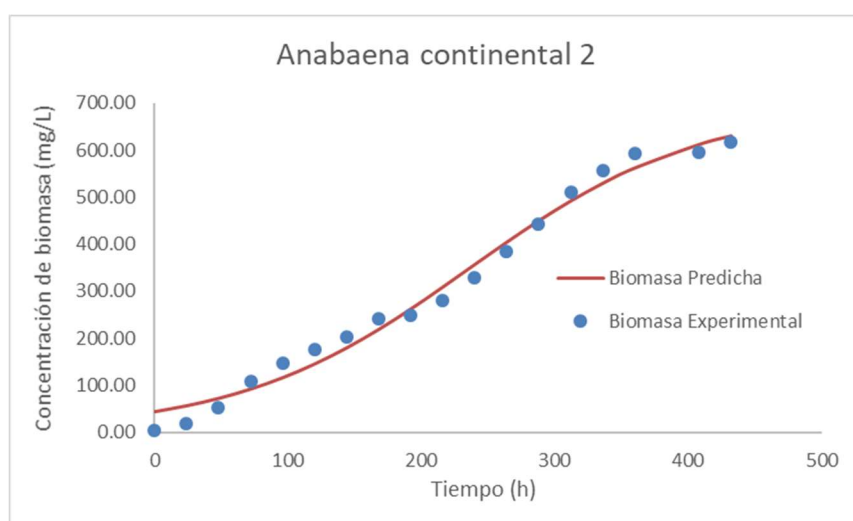


Figura A5- Ajuste del modelo de Verhulst para el biorreactor AD2

| Parámetro | Unidades | Valor |
|-----------|----------------------|---------|
| X_0 | mg/L | 42,8 |
| X_m | mg/L | 695,8 |
| μ | h^{-1} | 0,012 |
| R2 | | 0,98449 |
| dX/dt | $mg\ L^{-1}\ h^{-1}$ | 1,5 |

Tabla A15- Parámetros cinéticos obtenidos del biorreactor AD2

Para el reactor AD3 se han obtenido los siguientes datos:

| REACTOR 3- ANABAENA CONTINENTAL | | | | |
|--|----------|-------------------|--------------------|------------------|
| t (horas) | X (mg/L) | X_{pred} (mg/L) | $(X - X_{pred})^2$ | $(X - X_{av})^2$ |
| 0 | 2,45805 | 72,39 | 4890,88 | 200517,47 |
| 24 | 21,7546 | 89,60 | 4602,76 | 183608,15 |
| 48 | 56,1067 | 110,31 | 2938,43 | 155348,80 |
| 72 | 132,8688 | 134,97 | 4,42 | 100730,71 |

| | | | | |
|-----|-----------|-------------|-----------------|-------------------|
| 96 | 174,8547 | 163,92 | 119,55 | 75842,47 |
| 120 | 242,07455 | 197,37 | 1998,51 | 43336,94 |
| 144 | 267,3085 | 235,31 | 1023,95 | 33467,53 |
| 168 | 308,0221 | 277,45 | 934,70 | 20228,72 |
| 192 | 344,0706 | 323,18 | 436,47 | 11274,03 |
| 216 | 383,5119 | 371,57 | 142,64 | 4453,95 |
| 240 | 415,7435 | 421,43 | 32,29 | 1190,69 |
| 264 | 479,3585 | 471,41 | 63,25 | 847,32 |
| 288 | 507,7732 | 520,15 | 153,09 | 3308,94 |
| 312 | 547,6386 | 566,42 | 352,75 | 9484,57 |
| 336 | 607,0126 | 609,25 | 4,99 | 24574,57 |
| 360 | 643,0611 | 647,95 | 23,95 | 37176,19 |
| 456 | 709,6448 | 758,71 | 2406,96 | 67285,76 |
| 480 | 765,2019 | 776,50 | 127,56 | 99194,81 |
| 504 | 785,9828 | 791,15 | 26,74 | 112716,64 |
| 528 | 788,1033 | 803,13 | 225,90 | 114144,98 |
| 576 | 853,8388 | 820,71 | 1097,52 | 162884,07 |
| 600 | 869,1064 | 827,02 | 1771,08 | 175440,84 |
| | | Suma | 23378,40 | 1637058,13 |

Tabla A16- Datos de concentración de biomasa frente a tiempo del reactor AD3

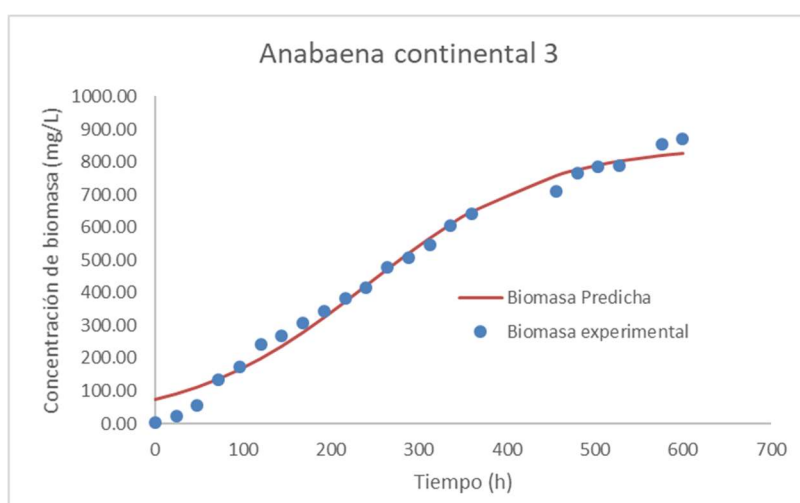


Figura A6- Ajuste del modelo de Verhulst para el biorreactor AD3

| Parámetro | Unidades | Valor |
|-----------|----------------------|---------|
| X_o | mg/L | 72,4 |
| X_m | mg/L | 851,7 |
| μ | h^{-1} | 0,010 |
| R2 | | 0,98572 |
| dX/dt | $mg\ L^{-1}\ h^{-1}$ | 1,5 |

Tabla A17- Parámetros cinéticos obtenidos del biorreactor AD3

Anexo IV- Composición de los medios de cultivo

El medio de cultivo empleado para el crecimiento de *Anabaena sp.* marina es el medio *F2 de Guillard*, el cual tiene la siguiente composición (Fuente: Banco Español de Algas):

| Componente | Solución en Stock (g/L dH ₂ O) | Adición a 1L de agua destilada (mL) |
|---|--|--|
| NaNO ₃ | 75 | 1 |
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 5 | 1 |
| Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O | 30 | 1 |
| Solución de elementos traza | | 1 |
| Solución de vitaminas | | 0,5 |

Tabla A18- Composición del medio F2 de Guillard

La solución de elementos traza tiene la siguiente composición:

| Componente | Adición a 1L de agua destilada (g) |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Na ₂ EDTA | 0,436 |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O | 0,315 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,010 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,022 |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0,010 |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 0,180 |
| NaMoO ₄ ·2H ₂ O | 0,006 |

Tabla A19- Solución de elementos traza del medio F2 de Guillard

La composición de la solución de vitaminas es:

| Componente | 1ª Solución en stock (g/L dH ₂ O) | Adición a 1L de agua destilada |
|-----------------|---|-----------------------------------|
| Tiamina-HCl | | 200 mg |
| Biotina | 1,00 | 1 mL |
| Cianocobalamina | 1,00 | 1 mL |

Tabla A20- Solución de vitaminas del medio F2 de Guillard

El medio no marino, empleado para el cultivo de *Anabaena sp.* continental es adaptado de: Fábregas, J.; Domínguez, A.; Regueiro, M.; Maseda, A. & Otero, A. 2000. *Optimización of culture médium for the continuous cultivation of the microalga Haematococcus pluvialis. Applied Microbiology and Biotechnology*: 53(5): 530-535.

Consta de cuatro soluciones (la masa especificada en cada solución es para un litro de agua destilada):

Solución A:

| Componente | Masa (g) |
|----------------------------------|----------|
| KNO ₃ | 80,88 |
| HNa ₂ PO ₄ | 5,67 |

Tabla A21- Solución A del medio de cultivo no marino

Solución B:

| Componente | Masa (g) |
|--------------------------------------|----------|
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 49,3 |

Tabla A22- Solución B del medio de cultivo no marino

Solución C:

| Componente | Masa (g) |
|--------------------------------------|----------|
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 22,19 |

Tabla A23- Solución C del medio de cultivo no marino

Solución D:

| Componente | Masa (mg) |
|---|-----------|
| C ₆ H ₅ FeO ₇ ·5H ₂ O | 525,94 |
| Cl ₂ Co·6H ₂ O | 2,37 |
| SO ₄ Cu·5H ₂ O | 2,49 |
| CrO ₃ | 15,19 |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 197,9 |
| Na ₂ MoO ₄ ·4H ₂ O | 24,19 |
| SeO ₂ | 1,1 |
| Tiamina | 35 |
| Cianocobalamina | 30 |
| Biotina | 50 |
| EDTA | 1,22 |

Tabla A24- Solución D del medio de cultivo no marino

Para elaborar un litro de medio de cultivo no marino se ha de añadir 5 mL de cada una de las cuatro soluciones anteriores (A, B, C y D) por cada litro de agua destilada.

Anexo V- Concentración de MAAs

En las siguientes tablas se muestran los datos medidos experimentalmente que han permitido hallar la concentración inicial de MAAs producidas por *Anabaena sp.* continental antes del estresado celular.

| ANABAENA SP. CONTINENTAL; INICIAL | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coficiente</i> | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| <i>A₆₆₆</i> | 2,678 | 2,88 | 2,932 | 2,704 | 2,862 | 2,868 |
| <i>Coficiente</i> | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| <i>A₆₅₃</i> | 1,31 | 1,428 | 1,454 | 1,338 | 1,412 | 1,418 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 10,1 | 10,1 | 10,1 | 10 | 10 | 10 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 27,9165 | 30,047 | 31,2215 | 28,5645 | 29,7065 | 29,6665 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 43,377 | 46,593 | 47,3905 | 43,6285 | 46,178 | 46,214 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| <i>Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa)</i> | 8224,68 | 8827,016 | 9180,108 | 8503,424 | 8851,248 | 8845,231 |
| Promedio | 8738,61806 | | | | | |
| Desviación | 330,5225878 | | | | | |

Tabla A25- Extracción de MAAs de *Anabaena sp.* continental sin estresar (1)

| ANABAENA SP. CONTINENTAL; INICIAL | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|----------|----------|---------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coficiente</i> | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| <i>A_{663,6}</i> | 3,3268 | 3,358 | 3,266 | 2,9804 | 3,152 | 3,1776 |
| <i>Coficiente</i> | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| <i>A_{646,6}</i> | 0,9276 | 0,9504 | 0,8896 | 0,7932 | 0,8336 | 0,8392 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 9,8 | 9,8 | 9,8 | 9,9 | 9,9 | 9,9 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 28,1885 | 30,1035 | 28,641 | 26,4745 | 27,255 | 27,1575 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 47,8805 | 48,795 | 46,229 | 41,65 | 43,6835 | 43,994 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| <i>Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa)</i> | 9224,478 | 9748,122 | 9543,545 | 8857,191 | 9197,793 | 9174,86 |
| Promedio | 9290,998077 | | | | | |
| Desviación | 312,2599852 | | | | | |

Tabla A26- Extracción de MAAs de *Anabaena sp.* continental sin estresar (2)

| ANABAENA SP, CONTINENTAL; INICIAL | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coficiente</i> | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| <i>A666</i> | 2,397 | 2,499 | 2,547 | 2,94 | 2,808 | 2,901 |
| <i>Coficiente</i> | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| <i>A653</i> | 1,11 | 1,149 | 1,164 | 1,32 | 1,374 | 1,413 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 10 | 10 | 10 | 10,1 | 10,1 | 10,1 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A308-353</i> | 18,644 | 18,4745 | 18,947 | 21,0655 | 19,8845 | 20,5015 |
| <i>A621-704</i> | 24,165 | 24,976 | 25,1745 | 32,155 | 30,5185 | 31,535 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| <i>Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa)</i> | 9055,18364 | 9068,808 | 9420,273 | 9416,345 | 8730,061 | 9011,606 |
| <i>Promedio</i> | 9117,045943 | | | | | |
| <i>Desviación</i> | 264,0284989 | | | | | |

Tabla A27- Extracción de MAAs de *Anabaena sp. continental sin estresar* (3)

| ANABAENA SP, CONTINENTAL; INICIAL | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coficiente</i> | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| <i>A663,6</i> | 2,6796 | 2,541 | 2,6466 | 2,8734 | 2,8056 | 2,73 |
| <i>Coficiente</i> | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| <i>A646,6</i> | 0,6222 | 0,5892 | 0,6114 | 0,672 | 0,6732 | 0,5982 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 10,1 | 10,1 | 10,1 | 10,1 | 10,1 | 10,1 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A308-353</i> | 17,1145 | 16,516 | 17,334 | 18,5775 | 18,542 | 17,715 |
| <i>A621-704</i> | 23,3365 | 22,093 | 23,0235 | 25,138 | 24,959 | 24,436 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| <i>Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa)</i> | 9073,13 | 8770,898 | 9202,102 | 9800,599 | 9606,761 | 9163,744 |
| <i>Promedio</i> | 9269,539066 | | | | | |
| <i>Desviación</i> | 373,8187923 | | | | | |

Tabla A28- Extracción de MAAs de *Anabaena sp. continental sin estresar* (4)

| ANABAENA SP, CONTINENTAL; INICIAL | | | | | | |
|---|-------------|----------|---------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coficiente</i> | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| <i>A₆₆₆</i> | 2,562 | 2,58 | 2,532 | 2,583 | 2,622 | 2,619 |
| <i>Coficiente</i> | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| <i>A₆₅₃</i> | 1,188 | 1,191 | 1,167 | 1,197 | 1,218 | 1,224 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 10,1 | 10,1 | 10,1 | 10,2 | 10,2 | 10,2 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 19,429 | 19,9875 | 19,363 | 20,304 | 20,707 | 20,6635 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 25,9055 | 26,2015 | 25,5005 | 26,127 | 26,5545 | 26,6155 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 9311,74999 | 9549,602 | 9332,76 | 9633,981 | 9806,414 | 9735,691 |
| Promedio | 9561,699669 | | | | | |
| Desviación | 205,1423462 | | | | | |

Tabla A29- Extracción de MAAs de *Anabaena sp. continental sin estresar* (5)

| ANABAENA SP, CONTINENTAL; INICIAL | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coficiente</i> | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| <i>A_{663,6}</i> | 2,652 | 2,691 | 2,6994 | 2,5962 | 2,6784 | 2,709 |
| <i>Coficiente</i> | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| <i>A_{646,6}</i> | 0,6084 | 0,6174 | 0,6252 | 0,5946 | 0,6102 | 0,6204 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 10 | 10 | 10 | 9,9 | 9,9 | 9,9 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 16,171 | 16,513 | 16,651 | 15,5925 | 16,506 | 16,6515 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 22,9365 | 23,3095 | 23,4265 | 22,4445 | 23,1515 | 23,4185 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 8724,248 | 8895,074 | 8948,215 | 8501,392 | 9003,234 | 9079,262 |
| Promedio | 8858,570853 | | | | | |
| Desviación | 211,9529921 | | | | | |

Tabla A30- Extracción de MAAs de *Anabaena sp. continental sin estresar* (6)

| ANABAENA SP. CONTINENTAL; INICIAL | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|---------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| Coficiente | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| <i>A₆₆₆</i> | 2,244 | 2,412 | 2,436 | 2,199 | 2,325 | 2,373 |
| Coficiente | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| <i>A₆₅₃</i> | 1,053 | 1,131 | 1,143 | 1,026 | 1,095 | 1,113 |
| Factor de conversión | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Masa (mg) | 10 | 10 | 10 | 9,9 | 9,9 | 9,9 |
| Volumen (L) | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 18,839 | 18,849 | 18,8945 | 17,302 | 18,3575 | 18,8015 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 22,8605 | 24,623 | 24,8615 | 22,468 | 23,799 | 24,2625 |
| Factor de conversión | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 9021,14215 | 9009,104 | 9031,549 | 8357,71 | 8827,958 | 9062,433 |
| Promedio | 8884,982623 | | | | | |
| Desviación | 271,3611803 | | | | | |

Tabla A31- Extracción de MAAs de *Anabaena sp. continental* sin estresar (7)

Los datos para el cálculo de la concentración de microsporinas antes del estresado en *Anabaema sp. marina*, se recogen en las siguientes tablas:

| ANABAENA SP. MARINA; INICIAL | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| Coficiente | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| <i>A₆₆₆</i> | 1,773 | 2,1 | 2,205 | 0,513 | 0,483 | 0,528 |
| Coficiente | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| <i>A₆₅₃</i> | 1,05 | 1,182 | 1,242 | 0,237 | 0,219 | 0,237 |
| Factor de conversión | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Masa (mg) | 10,2 | 10,2 | 10,2 | 3,9 | 3,9 | 3,9 |
| Volumen (L) | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 23,8125 | 26,233 | 26,4715 | 8,477 | 7,2395 | 7,255 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 22,9855 | 25,684 | 26,033 | 5,9585 | 5,5075 | 5,683 |
| Factor de conversión | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 8134,55746 | 9680,281 | 10116,57 | 9168,934 | 8017,197 | 8534,777 |
| Promedio | 8942,052548 | | | | | |
| Desviación | 854,3097481 | | | | | |

Tabla A32- Extracción de MAAs de *Anabaena sp. marina* sin estresar (1)

| ANABAENA SP, MARINA; INICIAL | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coficiente</i> | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| <i>A_{663,6}</i> | 2,7096 | 2,8476 | 2,8866 | 1,83 | 1,8492 | 1,9002 |
| <i>Coficiente</i> | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| <i>A_{646,6}</i> | 0,6342 | 0,666 | 0,6744 | 0,4284 | 0,4296 | 0,4446 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 10 | 10 | 10 | 6,9 | 6,9 | 6,9 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 18,789 | 19,8605 | 19,7745 | 12,9525 | 13,0565 | 12,9825 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 23,548 | 24,6995 | 25,0115 | 15,7075 | 15,989 | 16,5135 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 10077,63 | 10673,36 | 10638,89 | 10194,08 | 10204,91 | 10092,08 |
| Promedio | 10313,49179 | | | | | |
| Desviación | 270,5897625 | | | | | |

Tabla A33- Extracción de MAAs de *Anabaena sp. marina* sin estresar (2)

| ANABAENA SP, MARINA; INICIAL | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coficiente</i> | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| <i>A₆₆₆</i> | 1,551 | 1,635 | 1,662 | 1,668 | 1,881 | 1,833 |
| <i>Coficiente</i> | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| <i>A₆₅₃</i> | 0,732 | 0,771 | 0,786 | 0,765 | 0,87 | 0,846 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 8 | 8 | 8 | 9,8 | 9,8 | 9,8 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 13,6135 | 13,8435 | 14,47 | 14,2085 | 15,904 | 16,679 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 15,847 | 16,675 | 17,0535 | 16,595 | 18,858 | 18,6485 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 8111,55677 | 8265,528 | 8580,281 | 7154,414 | 7928,589 | 8198,613 |
| Promedio | 8039,830385 | | | | | |
| Desviación | 483,6775185 | | | | | |

Tabla A34- Extracción de MAAs de *Anabaena sp. marina* sin estresar (3)

| ANABAENA SP, MARINA; INICIAL | | | | | | |
|---|-------------|----------|---------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| Análisis | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| Coeficiente | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| $A_{663,6}$ | 1,674 | 1,83 | 1,8522 | 1,4172 | 1,5204 | 1,5372 |
| Coeficiente | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| $A_{646,6}$ | 0,3846 | 0,4218 | 0,4278 | 0,327 | 0,348 | 0,3558 |
| Factor de conversión | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Masa (mg) | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 |
| Volumen (L) | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| $A_{308-353}$ | 11,573 | 12,6955 | 12,911 | 9,62 | 10,7975 | 10,7815 |
| $A_{621-704}$ | 14,424 | 15,772 | 16,0185 | 12,1535 | 13,0765 | 13,232 |
| Factor de conversión | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (μg MAAs/g biomasa) | 6596,367 | 7233,237 | 7329,92 | 5508,079 | 6166,809 | 6149,088 |
| Promedio | 6497,250007 | | | | | |
| Desviación | 700,5293854 | | | | | |

Tabla A35- Extracción de MAAs de *Anabaena sp. marina* sin estresar (4)

| ANABAENA SP, MARINA; INICIAL | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| Análisis | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| Coeficiente | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| A_{666} | 2,277 | 2,439 | 2,598 | 2,265 | 2,55 | 2,556 |
| Coeficiente | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| A_{653} | 0,957 | 1,161 | 1,212 | 0,933 | 1,206 | 1,215 |
| Factor de conversión | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Masa (mg) | 10,1 | 10,1 | 10,1 | 10,2 | 10,2 | 10,2 |
| Volumen (L) | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| $A_{308-353}$ | 20,044 | 23,115 | 24,1515 | 20,6045 | 23,1595 | 22,8795 |
| $A_{621-704}$ | 28,699 | 32,969 | 33,7485 | 28,4985 | 33,22 | 33,4405 |
| Factor de conversión | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (μg MAAs/g biomasa) | 7907,48727 | 8225,715 | 8994,752 | 8102,277 | 8483,413 | 8333,039 |
| Promedio | 8341,113978 | | | | | |
| Desviación | 375,7522443 | | | | | |

Tabla A36- Extracción de MAAs de *Anabaena sp. marina* sin estresar (5)

Los resultados experimentales, acerca de la concentración de MAAs, obtenidos tras el estresado celular de los experimentos realizados con *Anabaena sp.* continental y marina, se muestran en las siguientes tablas, en las que aparecen las condiciones en las que se ha realizado cada experimento.

| ANABAENA SP. CONTINENTAL; DOSIS=51,84 kJ; Q=3,525 L/h | | | | | | |
|--|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coficiente</i> | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| <i>A₆₆₆</i> | 3,753 | 4,035 | 4,2 | 3,735 | 4,026 | 4,2 |
| <i>Coficiente</i> | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| <i>A₆₅₃</i> | 1,725 | 1,839 | 1,908 | 1,707 | 1,836 | 1,911 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 10,1 | 10,1 | 10,1 | 10 | 10 | 10 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 26,8835 | 28,5065 | 29,768 | 26,805 | 28,737 | 30,196 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 37,9825 | 40,6455 | 42,367 | 37,73 | 40,5745 | 42,2895 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 12904,2566 | 13779,45 | 14381,71 | 13039,75 | 14020,68 | 14755,09 |
| Promedio | 13813,49051 | | | | | |
| Desviación | 731,976693 | | | | | |

Tabla A37- Extracción con metanol del MAAs de *Anabaena sp.* continental. Dosis=51,84 kJ, Q=3,25 L/h

| ANABAENA SP. CONTINENTAL; DOSIS=51,84 kJ; Q=3,525 L/h | | | | | | |
|--|-------------|---------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coficiente</i> | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| <i>A_{663,6}</i> | 4,1676 | 4,53372 | 4,575 | 3,8346 | 4,2384 | 4,2696 |
| <i>Coficiente</i> | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| <i>A_{646,6}</i> | 0,9462 | 1,0398 | 1,0566 | 0,8748 | 0,9672 | 0,326 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 10,2 | 10,2 | 10,2 | 9,9 | 9,9 | 9,9 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 24,089 | 26,4785 | 26,679 | 22,904 | 24,8185 | 24,9615 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 35,498 | 38,8085 | 39,041 | 32,715 | 36,1895 | 35,5025 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 12944,07 | 14150,5 | 14296,78 | 12656,55 | 13703,12 | 14621,83 |
| Promedio | 13728,80823 | | | | | |
| Desviación | 782,8290914 | | | | | |

Tabla A38- Extracción con acetona del MAAs de *Anabaena sp.* continental. Dosis=51,84 kJ, Q=3,25 L/h

| ANABAENA SP, CONTINENTAL; DOSIS=51,84 kJW; Q=7,05 L/h | | | | | | |
|--|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coefficiente</i> | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| <i>A₆₆₆</i> | 3,564 | 3,6 | 3,45 | 3,675 | 3,633 | 3,402 |
| <i>Coefficiente</i> | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| <i>A₆₅₃</i> | 1,659 | 1,662 | 1,593 | 1,692 | 1,674 | 1,569 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 9,9 | 9,9 | 9,9 | 9,8 | 9,8 | 9,8 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 26,527 | 26,657 | 25,515 | 26,995 | 26,78 | 25,256 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 36,168 | 36,3045 | 34,747 | 37,07 | 36,6025 | 34,284 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 12909,6715 | 13084,67 | 12539,72 | 13392,57 | 13298,89 | 12535,67 |
| Promedio | 12960,19663 | | | | | |
| Desviación | 367,8936072 | | | | | |

Tabla A39- Extracción con metanol del MAAs de *Anabena sp.* continental. Dosis=51,84 kJ, Q=7,05 L/h

| ANABAENA SP, CONTINENTAL; DOSIS=51,84 kJ; Q=7,05 L/h | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coefficiente</i> | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| <i>A_{663,6}</i> | 3,6168 | 3,855 | 3,9006 | 3,9612 | 3,8088 | 3,9402 |
| <i>Coefficiente</i> | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| <i>A_{646,6}</i> | 0,8412 | 0,8982 | 0,9078 | 0,924 | 0,8904 | 0,921 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 10,1 | 10,1 | 10 | 9,8 | 9,8 | 9,8 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 21,781 | 23,6265 | 24,0425 | 24,219 | 23,4635 | 24,339 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 30,9445 | 33,007 | 33,4145 | 33,9335 | 32,649 | 33,886 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 11752,8 | 12737,98 | 13085,95 | 13449,53 | 13020,13 | 13461,95 |
| Promedio | 12918,05687 | | | | | |
| Desviación | 633,5851212 | | | | | |

Tabla A40- Extracción con acetona del MAAs de *Anabena sp.* continental. Dosis=51,84 kJ, Q=7,05 L/h

| ANABAENA SP, CONTINENTAL; DOSIS=51,84 kJ; Q=10,575 L/h | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coeficiente</i> | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| <i>A₆₆₆</i> | 3,378 | 3,327 | 3,396 | 3,081 | 3,276 | 3,249 |
| <i>Coeficiente</i> | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| <i>A₆₅₃</i> | 1,551 | 1,518 | 1,554 | 1,407 | 1,491 | 1,479 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 10 | 10 | 10 | 10,1 | 10,1 | 10,1 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 25,946 | 25,357 | 25,91 | 25,91 | 24,9815 | 25,0485 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 34,354 | 33,6215 | 34,3675 | 31,0475 | 32,967 | 32,687 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 12521,3822 | 12336,18 | 12577,35 | 12512,78 | 12092,17 | 12127,03 |
| Promedio | 12361,14903 | | | | | |
| Desviación | 211,280861 | | | | | |

Tabla A41- Extracción con metanol del MAAs de *Anabena sp. continental*. Dosis=51,84 kJ, Q=10,575 L/h

| ANABAENA SP, CONTINENTAL; DOSIS=51,84 kJ; Q=10,575 L/h | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coeficiente</i> | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| <i>A_{663,6}</i> | 3,7518 | 3,8658 | 3,8112 | 3,99762 | 4,014 | 3,9174 |
| <i>Coeficiente</i> | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| <i>A_{646,6}</i> | 0,7902 | 0,8178 | 0,8034 | 0,9108 | 0,9168 | 0,8976 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 10 | 10 | 10 | 9,9 | 9,9 | 9,9 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 20,509 | 21,0425 | 20,713 | 23,279 | 23,698 | 23,1755 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 29,615 | 30,6005 | 30,1615 | 34,077 | 34,436 | 33,5575 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 12173 | 12452,19 | 12261,96 | 12875,49 | 13022,13 | 12751,86 |
| Promedio | 12589,43708 | | | | | |
| Desviación | 344,9411643 | | | | | |

Tabla A42- Extracción con acetona del MAAs de *Anabena sp. continental*. Dosis=51,84 kJ, Q=10,575 L/h

| ANABAENA SP, CONTINENTAL; DOSIS=51, 84 kJ; Q=14,1 L/h | | | | | | |
|--|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| Coeficiente | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| A_{666} | 3,186 | 3,156 | 3,024 | 2,925 | 2,984 | 2,925 |
| Coeficiente | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| A_{653} | 1,467 | 1,44 | 1,389 | 1,299 | 1,284 | 1,209 |
| Factor de conversión | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Masa (mg) | 10 | 10 | 10 | 9,9 | 9,9 | 9,9 |
| Volumen (L) | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| $A_{308-353}$ | 24,7345 | 23,8665 | 22,661 | 20,8615 | 21,141 | 19,9205 |
| $A_{621-704}$ | 32,0065 | 31,233 | 30,3625 | 28,167 | 28,0555 | 26,421 |
| Factor de conversión | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 12074,5565 | 11856,53 | 11075,84 | 10836,43 | 11339,73 | 11232,68 |
| Promedio | 11402,62767 | | | | | |
| Desviación | 472,8040735 | | | | | |

Tabla A43- Extracción con metanol del MAAs de *Anabena sp.* continental. Dosis=51,84 kJ, Q=14,1 L/h

| ANABAENA SP, CONTINENTAL; DOSIS=51, 84 kJ; Q=14,1 L/h | | | | | | |
|--|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| Coeficiente | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| $A_{663,6}$ | 3,594 | 3,738 | 3,5832 | 3,315 | 3,2232 | 3,12 |
| Coeficiente | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| $A_{646,6}$ | 0,8436 | 0,8586 | 0,8298 | 0,7674 | 0,7278 | 0,7206 |
| Factor de conversión | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Masa (mg) | 10,1 | 10,1 | 10,1 | 9,9 | 9,9 | 9,9 |
| Volumen (L) | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| $A_{308-353}$ | 22,6035 | 22,2965 | 21,802 | 20,8155 | 20,816 | 18,728 |
| $A_{621-704}$ | 31,1825 | 32,0705 | 30,866 | 28,631 | 27,414 | 26,924 |
| Factor de conversión | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 12021,58 | 12005,13 | 11687,04 | 11353,92 | 11544,21 | 10225,13 |
| Promedio | 11472,83396 | | | | | |
| Desviación | 664,2805326 | | | | | |

Tabla A44- Extracción con acetona del MAAs de *Anabena sp.* continental. Dosis=51,84 kJ, Q=14,1 L/h

| ANABAENA SP, CONTINENTAL; DOSIS=25, 92 kJ; Q=3,525 L/h | | | | | | |
|---|-------------|---------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coeficiente</i> | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| <i>A₆₆₆</i> | 3,294 | 3,246 | 3,162 | 3 | 3,207 | 3,255 |
| <i>Coeficiente</i> | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| <i>A₆₅₃</i> | 1,521 | 1,503 | 1,461 | 1,383 | 1,482 | 1,497 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 9,9 | 9,9 | 9,9 | 9,8 | 9,8 | 9,8 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 25,198 | 24,86 | 23,974 | 25,198 | 24,86 | 24,378 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 33,3495 | 32,793 | 32,048 | 30,325 | 32,3525 | 32,7955 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 12319,3657 | 12170,9 | 11706,07 | 12470,34 | 12319,53 | 12111,85 |
| Promedio | 12183,0109 | | | | | |
| Desviación | 265,5075656 | | | | | |

Tabla A45- Extracción con metanol del MAAs de *Anabena sp. continental*. Dosis=25,92 kJ, Q=3,25 L/h

| ANABAENA SP, CONTINENTAL; DOSIS=25,92 kJ; Q=3,525 L/h | | | | | | |
|--|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coeficiente</i> | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| <i>A_{663,6}</i> | 3,5574 | 3,6666 | 3,8052 | 3,5634 | 3,276 | 3,3762 |
| <i>Coeficiente</i> | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| <i>A_{646,6}</i> | 0,8256 | 0,8562 | 0,8944 | 0,8328 | 0,7602 | 0,7866 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 10,1 | 10,1 | 10,1 | 9,8 | 9,8 | 9,8 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 22,715 | 23,144 | 33,375 | 22,372 | 21,035 | 21,564 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 30,4285 | 31,444 | 49,1285 | 30,543 | 28,0475 | 29,987 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 12261,25 | 12456,56 | 11927,61 | 12415,61 | 11691,23 | 11550,58 |
| Promedio | 12050,47373 | | | | | |
| Desviación | 383,8490002 | | | | | |

Tabla A46- Extracción con acetona del MAAs de *Anabena sp. continental*. Dosis=25,92 kJ, Q=3,25 L/h

| ANABAENA SP, CONTINENTAL; DOSIS=25,92 kJ; Q=7,05 L/h | | | | | | |
|---|-------------|---------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| Coficiente | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| <i>A₆₆₆</i> | 4,557 | 4,44 | 4,251 | 4,056 | 4,293 | 4,302 |
| Coficiente | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| <i>A₆₅₃</i> | 2,367 | 2,304 | 2,211 | 2,007 | 2,118 | 2,127 |
| Factor de conversión | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Masa (mg) | 10 | 10 | 10 | 10,1 | 10,1 | 10,1 |
| Volumen (L) | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 33,5065 | 32,889 | 31,685 | 28,5645 | 29,7965 | 29,6665 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 51,6225 | 50,3785 | 48,525 | 43,6285 | 46,178 | 46,214 |
| Factor de conversión | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 13993,3036 | 13717,5 | 13126,35 | 12628,85 | 13185,24 | 13136,48 |
| Promedio | 13297,95286 | | | | | |
| Desviación | 484,8621002 | | | | | |

Tabla A47- Extracción con metanol del MAAs de *Anabena sp.* continental. Dosis=25,92 kJ, Q=7,05 L/h

| ANABAENA SP, CONTINENTAL; DOSIS=25,92 kJ; Q=7,05 L/h | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|---------|----------|----------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| Coficiente | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| <i>A_{663,6}</i> | 4,6992 | 4,7892 | 4,7814 | 4,68 | 4,5306 | 4,4712 |
| Coficiente | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| <i>A_{646,6}</i> | 1,218 | 1,2456 | 1,2408 | 1,218 | 1,188 | 1,1742 |
| Factor de conversión | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Masa (mg) | 9,8 | 9,8 | 9,8 | 10 | 10 | 10 |
| Volumen (L) | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 26,204 | 27,1535 | 27,245 | 26,401 | 25,7045 | 25,4095 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 43,0815 | 43,76 | 43,8045 | 42,963 | 41,771 | 41,445 |
| Factor de conversión | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 13520,19 | 14054,27 | 14066,15 | 13328,4 | 12915,44 | 12697,82 |
| Promedio | 13430,37817 | | | | | |
| Desviación | 568,105898 | | | | | |

Tabla A48- Extracción con acetona del MAAs de *Anabena sp.* continental. Dosis=25,92 kJ, Q=7,05 L/h

| ANABAENA SP, CONTINENTAL; DOSIS=25, 92 kJ; Q=10,575 L/h | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| Coeficiente | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| A_{666} | 2,988 | 3,285 | 3,372 | 2,874 | 3,042 | 3,144 |
| Coeficiente | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| A_{653} | 1,371 | 1,506 | 1,545 | 1,32 | 1,404 | 1,434 |
| Factor de conversión | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Masa (mg) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Volumen (L) | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| $A_{308-353}$ | 24,723 | 26,799 | 27,2765 | 23,528 | 24,922 | 25,795 |
| $A_{621-704}$ | 30,027 | 33,052 | 33,8445 | 28,8415 | 30,758 | 31,358 |
| Factor de conversión | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (μg MAAs/g biomasa) | 12076,7594 | 13077,89 | 13345,58 | 11505,79 | 12079,86 | 12716,23 |
| Promedio | 12467,01829 | | | | | |
| Desviación | 697,6105488 | | | | | |

Tabla A49- Extracción con metanol del MAAs de *Anabena sp.* continental. Dosis=25,92 kJ, Q=10,575 L/h

| ANABAENA SP, CONTINENTAL; DOSIS=25,92 kJ; Q=10,575 L/h | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| Coeficiente | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| $A_{663,6}$ | 3,9312 | 3,8514 | 3,7464 | 3,7464 | 3,7056 | 3,7428 |
| Coeficiente | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| $A_{646,6}$ | 0,9108 | 0,8892 | 0,8712 | 0,726 | 0,7764 | 0,7974 |
| Factor de conversión | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Masa (mg) | 10,2 | 10,2 | 10,2 | 9,9 | 9,9 | 9,9 |
| Volumen (L) | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| $A_{308-353}$ | 23,4265 | 22,973 | 22,347 | 19,2055 | 20,269 | 20,715 |
| $A_{621-704}$ | 33,9185 | 33,165 | 32,301 | 27,123 | 29,186 | 29,885 |
| Factor de conversión | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (μg MAAs/g biomasa) | 12414,37 | 12200,05 | 11848,53 | 12600,29 | 12181,76 | 12271,24 |
| Promedio | 12252,70902 | | | | | |
| Desviación | 252,3716739 | | | | | |

Tabla A50- Extracción con acetona del MAAs de *Anabena sp.* continental. Dosis=25,92 kJ, Q=10,575 L/h

| ANABAENA SP, CONTINENTAL; DOSIS=25,92 kJ; Q=14,1 L/h | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coficiente</i> | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| <i>A₆₆₆</i> | 2,586 | 2,721 | 2,853 | 2,382 | 2,433 | 2,487 |
| <i>Coficiente</i> | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| <i>A₆₅₃</i> | 1,209 | 1,269 | 1,329 | 0,972 | 0,99 | 1,02 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 10,1 | 10,1 | 10,1 | 9,8 | 9,8 | 9,8 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 20,551 | 21,5285 | 23,1095 | 16,824 | 17,114 | 17,4245 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 26,17 | 27,647 | 28,952 | 21,117 | 21,7745 | 22,175 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 9818,74355 | 10251,59 | 11021,82 | 9794,582 | 9876,061 | 10073,88 |
| Promedio | 10139,44732 | | | | | |
| Desviación | 466,1799419 | | | | | |

Tabla A51- Extracción con metanol del MAAs de *Anabena sp. continental*. Dosis=25,92 kJ, Q=14,1 L/h

| ANABAENA SP, CONTINENTAL; DOSIS=25,92 kJ; Q=14,1 L/h | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|----------|----------|---------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coficiente</i> | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| <i>A_{663,6}</i> | 1,4622 | 1,5222 | 1,578 | 1,3725 | 1,4022 | 1,434 |
| <i>Coficiente</i> | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| <i>A_{646,6}</i> | 0,3054 | 0,3192 | 0,327 | 0,2844 | 0,3006 | 0,3 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 10 | 10 | 10 | 9,8 | 9,8 | 9,8 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 16,396 | 16,854 | 17,0895 | 15,1605 | 16,115 | 16,3225 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 13,005 | 13,504 | 13,998 | 12,1615 | 12,6445 | 12,7285 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 8640,234 | 8902,761 | 9032,676 | 8185,775 | 8536,547 | 8794,1 |
| Promedio | 8682,015701 | | | | | |
| Desviación | 301,1365124 | | | | | |

Tabla A52- Extracción con acetona del MAAs de *Anabena sp. continental*. Dosis=25,92 kJ, Q=14,1 L/h

| ANABAENA SP, MARINA; DOSIS=51,84 kJ; Q=3,525 L/h | | | | | | |
|---|-------------|---------|----------|----------|----------|---------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| Análisis | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| Coeficiente | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| A_{666} | 1,056 | 1,143 | 1,407 | 0,954 | 1,17 | 1,233 |
| Coeficiente | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| A_{653} | 0,51 | 0,549 | 0,66 | 0,468 | 0,549 | 0,579 |
| Factor de conversión | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Masa (mg) | 10 | 10 | 10 | 9,8 | 9,8 | 10 |
| Volumen (L) | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| $A_{308-353}$ | 16,868 | 16,8025 | 18,228 | 15,831 | 17,0475 | 17,436 |
| $A_{621-704}$ | 17,455 | 17,8785 | 19,691 | 15,6255 | 17,0755 | 17,644 |
| Factor de conversión | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs ($\mu\text{g MAAs/g biomasa}$) | 4937,16455 | 5205,4 | 6354,419 | 4749,588 | 5814,588 | 5942,81 |
| Promedio | 5500,661814 | | | | | |
| Desviación | 631,1523586 | | | | | |

Tabla A53- Extracción con metanol del MAAs de *Anabena sp. marina*. Dosis=51,84 kJ, Q=3,525 L/h

| ANABAENA SP, MARINA; DOSIS=51,84 kJ; Q=3,525 L/h | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| Análisis | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| Coeficiente | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| $A_{663,6}$ | 1,6776 | 1,6056 | 1,5708 | 1,4694 | 1,6842 | 1,6512 |
| Coeficiente | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| $A_{646,6}$ | 0,3498 | 0,321 | 0,3258 | 0,3072 | 0,3522 | 0,3372 |
| Factor de conversión | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Masa (mg) | 9,9 | 9,9 | 9,9 | 10,2 | 10,2 | 10,2 |
| Volumen (L) | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| $A_{308-353}$ | 20,5975 | 20,7205 | 19,4175 | 18,31 | 19,916 | 20,214 |
| $A_{621-704}$ | 14,86 | 13,9545 | 13,854 | 13,01 | 14,9135 | 14,461 |
| Factor de conversión | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs ($\mu\text{g MAAs/g biomasa}$) | 11009,64 | 11308,98 | 10426,35 | 9502,176 | 10334,35 | 10616,56 |
| Promedio | 10533,00822 | | | | | |
| Desviación | 624,4592279 | | | | | |

Tabla A54- Extracción con acetona del MAAs de *Anabena sp. marina*. Dosis=51,84 kJ, Q=3,525 L/h

| ANABAENA SP, MARINA; DOSIS=51,84 kJ; Q=7,05 L/h | | | | | | |
|---|-------------|---------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| Análisis | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| Coefficiente | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| A_{666} | 1,008 | 1,128 | 1,284 | 0,927 | 1,071 | 1,143 |
| Coefficiente | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| A_{653} | 0,474 | 0,519 | 0,567 | 0,444 | 0,486 | 0,522 |
| Factor de conversión | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Masa (mg) | 9,9 | 9,9 | 9,9 | 10 | 10 | 10 |
| Volumen (L) | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| $A_{308-353}$ | 17,144 | 18,594 | 19,675 | 16,927 | 17,861 | 18,0795 |
| $A_{621-704}$ | 15,4635 | 16,383 | 16,837 | 15,007 | 15,369 | 15,9205 |
| Factor de conversión | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 5503,49091 | 6343,13 | 7516,529 | 5070,913 | 6128,314 | 6379,883 |
| Promedio | 6157,043189 | | | | | |
| Desviación | 841,4419689 | | | | | |

Tabla A55- Extracción con metanol del MAAs de *Anabena sp. marina*. Dosis=51,84 kJ, Q=7,05 L/h

| ANABAENA SP, MARINA; DOSIS=51,84 kJ; Q=7,05 L/h | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| Análisis | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| Coefficiente | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| $A_{663,6}$ | 1,7532 | 3,165 | 3,2454 | 2,7402 | 2,9094 | 2,8848 |
| Coefficiente | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| $A_{646,6}$ | 0,369 | 0,7446 | 0,7524 | 0,642 | 0,6744 | 0,6732 |
| Factor de conversión | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Masa (mg) | 10 | 10 | 10 | 9,9 | 9,9 | 9,9 |
| Volumen (L) | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| $A_{308-353}$ | 20,95 | 23,2705 | 22,394 | 19,124 | 20,2585 | 20,065 |
| $A_{621-704}$ | 15,687 | 27,4925 | 28,9455 | 23,8825 | 19,625 | 25,064 |
| Factor de conversión | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 10970,2 | 12484,02 | 11709,37 | 10330,64 | 14147,63 | 10875,24 |
| Promedio | 11752,85071 | | | | | |
| Desviación | 1391,177569 | | | | | |

Tabla A56- Extracción con acetona del MAAs de *Anabena sp. marina*. Dosis=51,84 kJ, Q=7,05 L/h

| ANABAENA SP, MARINA; DOSIS=51,84 kJ; Q=10,575 L/h | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|---------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| Análisis | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| Coeficiente | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| A_{666} | 2,196 | 2,223 | 2,145 | 1,899 | 1,932 | 1,953 |
| Coeficiente | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| A_{653} | 1,011 | 1,023 | 0,987 | 0,861 | 0,888 | 0,897 |
| Factor de conversión | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Masa (mg) | 10,1 | 10,1 | 10,1 | 10,2 | 10,2 | 10,2 |
| Volumen (L) | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| $A_{308-353}$ | 17,794 | 18,2485 | 17,493 | 15,7505 | 16,029 | 16,294 |
| $A_{621-704}$ | 22,2835 | 22,556 | 21,7535 | 18,8995 | 19,5365 | 19,7635 |
| Factor de conversión | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (μg MAAs/g biomasa) | 8514,90235 | 8733,977 | 8376,888 | 7641,17 | 7625,028 | 7746,892 |
| Promedio | 8106,476222 | | | | | |
| Desviación | 492,1978587 | | | | | |

Tabla A57- Extracción con metanol del MAAs de *Anabena sp. marina*. Dosis=51,84 kJ, Q=10,575 L/h

| ANABAENA SP, MARINA; DOSIS=51,84 J; Q=10,575 L/h | | | | | | |
|---|-------------|----------|---------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| Análisis | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| Coeficiente | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| $A_{663,6}$ | 2,1726 | 2,3838 | 2,3928 | 2,3256 | 2,4378 | 2,5734 |
| Coeficiente | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| $A_{646,6}$ | 0,4974 | 0,5508 | 0,5442 | 0,5352 | 0,564 | 0,5946 |
| Factor de conversión | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Masa (mg) | 9,9 | 9,9 | 9,9 | 10,2 | 10,2 | 10,2 |
| Volumen (L) | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| $A_{308-353}$ | 14,914 | 16,1325 | 16,319 | 15,547 | 16,5175 | 17,091 |
| $A_{621-704}$ | 18,737 | 20,6075 | 20,5285 | 20,0745 | 21,131 | 22,255 |
| Factor de conversión | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (μg MAAs/g biomasa) | 8151,32 | 8792,234 | 8968,92 | 8237,831 | 8713,292 | 9037,235 |
| Promedio | 8650,138734 | | | | | |
| Desviación | 372,6828101 | | | | | |

Tabla A58- Extracción con acetona del MAAs de *Anabena sp. marina*. Dosis=51,84 kJ, Q=10,575 L/h

| ANABAENA SP, MARINA; DOSIS=51,84 kJ; Q=14,1 L/h | | | | | | |
|--|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coficiente</i> | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| <i>A₆₆₆</i> | 3,444 | 3,573 | 3,651 | 3,45 | 3,546 | 3,678 |
| <i>Coficiente</i> | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| <i>A₆₅₃</i> | 1,593 | 1,647 | 1,683 | 1,593 | 1,635 | 1,695 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 9,8 | 9,8 | 9,8 | 9,8 | 9,8 | 9,8 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 24,7075 | 25,814 | 26,388 | 24,553 | 25,3875 | 26,2625 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 34,6465 | 35,9155 | 36,7465 | 34,6885 | 35,7655 | 37,0445 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 12275,0371 | 12847,23 | 13116,02 | 12210,62 | 12591,13 | 13045,34 |
| Promedio | 12680,89596 | | | | | |
| Desviación | 385,6833035 | | | | | |

Tabla A59- Extracción con metanol del MAAs de *Anabena sp. marina*. Dosis=51,84 kJ, Q=14,1 L/h

| ANABAENA SP, MARINA; DOSIS=51,84 kJ; Q=14,1 L/h | | | | | | |
|--|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coficiente</i> | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| <i>A_{663,6}</i> | 2,334 | 2,412 | 2,4396 | 2,3736 | 2,3724 | 2,3958 |
| <i>Coficiente</i> | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| <i>A_{646,6}</i> | 0,4734 | 0,4872 | 0,4914 | 0,4194 | 0,4176 | 0,4254 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 23,267 | 24,1125 | 24,12 | 20,1365 | 20,5415 | 21,2385 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 20,2475 | 21,1205 | 21,3435 | 18,152 | 18,1245 | 18,3715 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 12587,26 | 12925,75 | 12942,67 | 12427,62 | 12692,23 | 13069,82 |
| Promedio | 12774,22351 | | | | | |
| Desviación | 245,1605418 | | | | | |

Tabla A60- Extracción con acetona del MAAs de *Anabena sp. marina*. Dosis=51,84 kJ, Q=14,1 L/h

| ANABAENA SP, MARINA; DOSIS=25,92 kJ; Q=3,525 L/h | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|--------|---------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coeficiente</i> | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| <i>A₆₆₆</i> | 2,961 | 3,285 | 3,36 | 2,643 | 2,775 | 2,91 |
| <i>Coeficiente</i> | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| <i>A₆₅₃</i> | 1,359 | 1,509 | 1,533 | 1,209 | 1,278 | 1,332 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 10,1 | 10,1 | 10,1 | 10,1 | 10,1 | 10,1 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 22,298 | 24,521 | 25,0465 | 20,228 | 21,261 | 22,256 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 29,817 | 33,1765 | 33,884 | 26,718 | 28,009 | 29,3745 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 10761,3191 | 11796,84 | 12089,88 | 9733,5 | 10227,4 | 10722,98 |
| Promedio | 10888,65194 | | | | | |
| Desviación | 903,6641631 | | | | | |

Tabla A61- Extracción con metanol del MAAs de *Anabena sp. marina*. Dosis=25,92 kJ, Q=3,525 L/h

| ANABAENA SP, MARINA; DOSIS=25,92 kJ; Q=3,525 L/h | | | | | | |
|---|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coeficiente</i> | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| <i>A_{663,6}</i> | 3,1278 | 3,309 | 3,3888 | 2,8524 | 2,9562 | 2,9958 |
| <i>Coeficiente</i> | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| <i>A_{646,6}</i> | 0,717 | 0,7584 | 0,7794 | 0,654 | 0,6726 | 0,6822 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 9,9 | 9,9 | 9,9 | 9,9 | 9,9 | 9,9 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 19,6285 | 20,103 | 21,2725 | 18,2705 | 19,262 | 18,773 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 26,9015 | 28,4315 | 29,1005 | 24,5185 | 25,285 | 25,5875 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 10756,62 | 11027,78 | 11673,96 | 10018,18 | 10618,45 | 10363,08 |
| Promedio | 10743,01402 | | | | | |
| Desviación | 571,5230472 | | | | | |

Tabla A62- Extracción con acetona del MAAs de *Anabena sp. marina*. Dosis=25,92 kJ, Q=3,525 L/h

| ANABAENA SP, MARINA; DOSIS=25,92 kJ; Q=7,05 L/h | | | | | | |
|--|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| Análisis | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| Coficiente | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| A_{666} | 0,687 | 0,75 | 0,801 | 0,696 | 0,783 | 0,81 |
| Coficiente | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| A_{653} | 0,327 | 0,345 | 0,36 | 0,342 | 0,375 | 0,39 |
| Factor de conversión | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Masa (mg) | 9,9 | 9,9 | 9,9 | 9,8 | 9,8 | 9,8 |
| Volumen (L) | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| $A_{308-353}$ | 10,6855 | 11,1515 | 11,1815 | 11,7485 | 12,2045 | 12,6055 |
| $A_{621-704}$ | 10,817 | 10,993 | 11,176 | 11,9675 | 12,583 | 12,839 |
| Factor de conversión | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 3330,52835 | 3769,824 | 3996,002 | 3355,877 | 3758,388 | 3929,577 |
| Promedio | 3690,032668 | | | | | |
| Desviación | 283,8807207 | | | | | |

Tabla A63- Extracción con metanol del MAAs de *Anabena sp. marina*. Dosis=25,92 kJ, Q=7,05 L/h

| ANABAENA SP, MARINA; DOSIS=25,92 kJ; Q=7,05 L/h | | | | | | |
|--|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| Análisis | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| Coficiente | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| $A_{663,6}$ | 2,0166 | 2,118 | 2,1018 | 2,055 | 2,142 | 2,166 |
| Coficiente | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| $A_{646,6}$ | 0,465 | 0,489 | 0,4788 | 0,4752 | 0,4584 | 0,4968 |
| Factor de conversión | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Masa (mg) | 10,1 | 10,1 | 10,1 | 9,8 | 9,8 | 9,8 |
| Volumen (L) | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| $A_{308-353}$ | 13,0485 | 13,7025 | 13,953 | 13,4285 | 13,879 | 14,487 |
| $A_{621-704}$ | 17,374 | 18,2465 | 17,9975 | 17,752 | 18,913 | 18,669 |
| Factor de conversión | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 6995,075 | 7345,651 | 7530,481 | 7398,386 | 7509,241 | 8002,748 |
| Promedio | 7463,597201 | | | | | |
| Desviación | 327,0832137 | | | | | |

Tabla A64- Extracción con acetona del MAAs de *Anabena sp. marina*. Dosis=25,92 kJ, Q=7,05 L/h

| ANABAENA SP, MARINA; DOSIS=25,92 kJ; Q=10,575 L/h | | | | | | |
|--|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coficiente</i> | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| <i>A₆₆₆</i> | 1,326 | 1,386 | 1,464 | 1,47 | 1,572 | 1,656 |
| <i>Coficiente</i> | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| <i>A₆₅₃</i> | 0,558 | 0,582 | 0,615 | 0,618 | 0,663 | 0,699 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 9,8 | 9,8 | 9,8 | 10,1 | 10,1 | 10,1 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 14,9715 | 15,583 | 16,406 | 16,4265 | 17,563 | 18,4265 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 12,166 | 12,7035 | 13,2825 | 13,4575 | 14,4545 | 15,245 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 8359,51235 | 8714,443 | 9267,655 | 8921,252 | 9489,289 | 9941,992 |
| Promedio | 9115,690401 | | | | | |
| Desviación | 568,5163686 | | | | | |

Tabla A65- Extracción con metanol del MAAs de *Anabena sp. marina*. Dosis=25,92 kJ, Q=10,575 L/h

| ANABAENA SP, MARINA; DOSIS=25,92 kJ; Q=10,575 L/h | | | | | | |
|--|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coficiente</i> | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| <i>A_{663,6}</i> | 1,569 | 1,599 | 1,5522 | 1,6278 | 1,5822 | 1,527 |
| <i>Coficiente</i> | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| <i>A_{646,6}</i> | 0,3312 | 0,336 | 0,3264 | 0,3522 | 0,3474 | 0,3264 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 9,9 | 9,9 | 9,9 | 9,9 | 9,9 | 9,9 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 16,995 | 17,1775 | 16,651 | 14,183 | 17,332 | 16,7605 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 14,038 | 14,283 | 13,832 | 14,733 | 14,444 | 13,787 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 8988,441 | 9101,755 | 8843,515 | 7406,692 | 8967,382 | 8779,098 |
| Promedio | 8681,147199 | | | | | |
| Desviación | 634,5807244 | | | | | |

Tabla A66- Extracción con acetonal del MAAs de *Anabena sp. marina*. Dosis=25,92 kJ, Q=10,575 L/h

| ANABAENA SP, MARINA; DOSIS=25,92 kJ; Q=14,1 L/h | | | | | | |
|--|-------------|----------|----------|---------|----------|----------|
| Extracción realizada con metanol | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coeficiente</i> | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 | 15,64 |
| <i>A₆₆₆</i> | 2,025 | 1,881 | 1,869 | 1,767 | 1,764 | 1,695 |
| <i>Coeficiente</i> | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 7,34 |
| <i>A₆₅₃</i> | 0,948 | 0,885 | 0,876 | 0,816 | 0,831 | 0,798 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 10,2 | 10,2 | 10,2 | 10,2 | 10,2 | 10,2 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 15,9735 | 14,426 | 14,44 | 13,735 | 13,5375 | 12,8805 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 20,577 | 19,1555 | 19,257 | 17,5775 | 18,063 | 17,363 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 7523,11488 | 6769,905 | 6704,994 | 6633,12 | 6315,869 | 6008,139 |
| Promedio | 6659,190269 | | | | | |
| Desviación | 510,5170298 | | | | | |

Tabla A67- Extracción con metanol del MAAs de *Anabena sp. marina*. Dosis=25,92 kJ, Q=14,1 L/h

| ANABAENA SP, MARINA; DOSIS=25,92 kJ; Q=14,1 L/h | | | | | | |
|--|-------------|----------|----------|----------|----------|---------|
| Extracción realizada con acetona | | | | | | |
| <i>Análisis</i> | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,2 | 2,3 |
| <i>Coeficiente</i> | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 | 12,25 |
| <i>A_{663,6}</i> | 2,1834 | 2,1732 | 2,148 | 1,761 | 1,7646 | 1,8294 |
| <i>Coeficiente</i> | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 | 2,55 |
| <i>A_{646,6}</i> | 0,5016 | 0,4968 | 0,4878 | 0,369 | 0,3678 | 0,4146 |
| <i>Factor de conversión</i> | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Masa (mg)</i> | 9,9 | 9,9 | 9,9 | 9,9 | 9,9 | 9,9 |
| <i>Volumen (L)</i> | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| <i>A₃₀₈₋₃₅₃</i> | 14,7265 | 14,4755 | 14,8785 | 13,221 | 12,1365 | 12,5225 |
| <i>A₆₂₁₋₇₀₄</i> | 18,6175 | 18,449 | 18,31 | 15,2445 | 15,285 | 15,5525 |
| <i>Factor de conversión</i> | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Contenido MAAs (µg MAAs/g biomasa) | 8139,364 | 8037,977 | 8230,657 | 7229,404 | 6633,932 | 6946,61 |
| Promedio | 7536,324054 | | | | | |
| Desviación | 686,1029288 | | | | | |

Tabla A68- Extracción con acetona del MAAs de *Anabena sp. marina*. Dosis=25,92 kJ, Q=14,1 L/h

Anexo VI- Factores que afectan al crecimiento celular

Antes de comenzar el diseño del proceso, es importante tener en cuenta los factores que más influyen en la cinética de crecimiento del microorganismo, ya que de esta depende tanto el diseño y modo del fotobiorreactor empleado como las horas de operación en la planta.

Factores ambientales

El crecimiento de las microalgas se ve influenciado de una manera importante por los siguientes factores ambientales:

- Luz: la disponibilidad de luz es el principal factor limitante en muchos cultivos de microalgas, al ser considerada como un nutriente más, puesto que es necesaria para que la microalga pueda realizar la fotosíntesis y, debido a ello, producir biomasa. Se habla de que la luz puede ser el factor limitante, puesto que el resto de nutrientes que el microorganismo necesita (carbono, nitrógeno, fósforo y otros oligoelementos) pueden ser aportados en exceso en la composición del medio de cultivo.

Esto hecho puede llevar a pensar que, a mayor intensidad luminosa, mayor será la velocidad de crecimiento de la microalga, lo cual no tiene por qué ser correcto. Esto se debe a que en determinados casos se da un fenómeno denominado fotoinhibición, que consiste en la reducción de la productividad cuando la microalga se ve expuesta a intensidades luminosas superiores a su óptima, sin tener por qué ser valores de radiación excesivamente altos.

Precisamente, esto parece ser que ha sucedido, no se ha medido experimentalmente, en el caso de *Anabaena sp.*, principalmente la especie marina, la cual, cuando se veía sometida a una elevada intensidad luminosa producía metabolitos secundarios que alteraban la coloración del cultivo y disminuía su productividad.

En cultivos de sistemas abiertos, la luz solar es la principal fuente de energía; mientras que, para sistemas de cultivo cerrados, hay diferentes fuentes luminosas que pueden ser empleadas además del Sol, tales como: lámparas de tungsteno o halógeno, diodos emisores de luz (LED), lámparas fluorescentes, fibra óptica y láser.

Este fenómeno se da cuando la microalga recibe más fotones de los que consume para la reacción fotosintética, lo que lleva a una sobreproducción de oxígeno que, además de inhibir la fotosíntesis, puede dañar la membrana de la célula, traduciéndose todo esto en una menor productividad.

- Temperatura: es el otro factor determinante en la velocidad de crecimiento del cultivo. La inmensa mayoría de las especies pueden aumentar su biomasa a temperaturas comprendidas entre los 5 y 40°C, encontrándose el óptimo en el caso de las microalgas en los 20 y 25°C. Cada microorganismo tiene su temperatura óptima de crecimiento, algunos de los cuales, los llamados termófilos, solo proliferan con temperaturas superiores a los 50°C.
- Salinidad: al trabajar con una especie que habita en agua dulce, este no será un factor a tener en cuenta en el proceso que nos concierne.
- Contaminaciones por otros organismos: en los biorreactores abiertos, al estar el cultivo en contacto con el ambiente, puede suceder que este se vea contaminado por la presencia de otros microorganismos, normalmente microalgas a las que el medio de cultivo le sea favorable. Protozoos, bacterias e insectos también son posibles candidatos como organismos causantes de originar contaminaciones. Trabajando en reactores cerrados también puede darse contaminación si no se ha trabajado manteniendo las condiciones de esterilidad en la preparación del medio de cultivo, pero es más complicado, debido a que el cultivo está aislado.

Factores operacionales

Los factores operacionales a tener en cuenta, son:

- Agitación: consiste en inducir un movimiento de un fluido que se encuentre en el interior de un recipiente o equipo, y es necesaria por varios motivos fundamentales que a continuación se exponen:
 - Evita la sedimentación y decantación de la biomasa celular. Al acumularse esta en el fondo, su productividad disminuye drásticamente al tener difícil acceso a los nutrientes.
 - A colación del punto anterior, una buena agitación también ayuda al transporte de los nutrientes y favorece la absorción de estos por las cianobacterias.

- Ayuda a la retirada del oxígeno disuelto producido en el proceso fotosintético, ya que altas concentraciones pueden ser inhibitorias del crecimiento celular.
- Además, la agitación hace que el volumen de cultivo esté en continuo movimiento, por lo que, en caso de haber una superficie del reactor provista de una mejor iluminación, el volumen total de biomasa se verá favorecido de igual manera por la luz.

La agitación puede provocarse de distintas maneras:

- a) Agitación mecánica: llevada a cabo gracias a unos instrumentos denominados agitadores, los cuales están conectados a un motor que origina el movimiento del eje del agitador de forma rotatoria. Los agitadores tienen en su extremo unas palas que son las responsables del movimiento del fluido.
 - b) Agitación por gas: Consiste en impulsar un gas a alta presión hacia el interior del reactor desde su base. Así, se formarán burbujas que irán ascendiendo mientras arrastran parte del líquido, generando el movimiento de este.
 - c) Agitación por recirculación: consiste en recircular una corriente de manera que se provoque el movimiento de fluidos y, con ello, su agitación.
- Nutrientes: una concentración adecuada de todos los nutrientes es un factor clave y determinante de cara a la composición en materia de la biomasa, lo cual está directamente relacionado con su productividad. Los principales nutrientes, al ser estos, los componentes principales de la célula son:
- Carbono: las cianobacterias al ser organismos autótrofos, no precisan de una fuente de materia orgánica como fuente de carbono, sino que lo incorporan a partir del CO₂. La concentración de CO₂ del aire no es suficiente, en algunos casos, para obtener una productividad adecuada, por lo que es necesario aportarlo junto con la corriente de aireación. También podría aportarse gracias a iones carbonato, pero esto variaría el pH del medio, pudiendo ser un factor contraproducente para el crecimiento de la microalga.
 - Oxígeno: todas las cianobacterias realizan la fotosíntesis oxigénica, esto es, en presencia de oxígeno, debido a que son organismos aerobios. Por ello, es necesario el aporte de este, que se realiza mediante la aireación a la que se ven sometidos. Es importante tener en cuenta que la fotosíntesis,

al ser un producto de este proceso el oxígeno, aumenta la concentración de este, lo que puede tener un efecto perjudicial. Por este motivo es muy importante su eliminación con la agitación.

- Nitrógeno: suele comprender entre un 1 y un 10% de la biomasa algal. Se ha de tener muy en cuenta la concentración en la que se encuentra este nutriente, el cual es asimilable en diferentes formas o estados de oxidación. Bajas concentraciones de nitrógeno producen defectos en el crecimiento y desarrollo del cultivo, mientras que un exceso de nitrógeno puede tener efectos inhibitorios.
 - Fósforo: se incorpora al medio en forma de fosfatos (sales), fácilmente asimilables por las microalgas. La proporción de carbono, nitrógeno y fósforo necesaria para el correcto desarrollo de un cultivo, cuando no se sabe la composición molecular de la microalga de interés, viene dada por la relación de Redfield. Esta relación establece que C:N:P es 106:16:1.
 - Azufre: se encuentra en sales inorgánicas en forma de grupos sulfato, los cuales son fácilmente asimilables por las cianobacterias y es necesario, por ejemplo, para la composición de aminoácidos.
 - Además, es necesaria la adición de otros nutrientes en mucha menor cantidad, principalmente sales iónicas y metales, los oligoelementos. Estos compuestos son indispensables para el crecimiento celular, aunque en concentraciones bajas, pudiendo altas concentraciones de estos resultar fuertemente inhibitorias. Se diferencian en este grupo los micronutrientes (manganeso, molibdeno, zinc, cobre, níquel, molibdeno, cobalto...) de los macronutrientes (sodio, potasio, magnesio, calcio e hierro), estando estos últimos en concentraciones ligeramente superiores.
- pH: el rango de pH para la mayoría de los cultivos de microalgas se encuentra entre 7 y 9. El O₂ producido en la fotosíntesis, provoca el aumento de este valor, pero es regulado por los grupos fosfatos y carbonatos, además del hecho de que una aireación rica en CO₂ favorece la desorción del oxígeno. No es un factor que nos deba preocupar debido a que se trabajará con una especie que habita en agua dulce, por lo que se usará agua destilada para la preparación del medio y salvo que la cianobacteria se viera sometida a condiciones de estrés, las cuales pudieran alterar la composición del medio, el pH no debería afectar a nuestro cultivo.

Modos de operación

A la hora de operar un biorreactor, puede realizarse de tres maneras distintas:

- 1) Cultivos discontinuos, por lotes, o batch: en este modo de operar el biorreactor, se introduce una concentración inicial baja de biomasa en el medio de cultivo y se espera a que, con el transcurso del tiempo, el microorganismo alcance la mayor concentración posible. De este modo, el cultivo experimenta todas las fases de crecimiento de un cultivo celular -latencia, en la que crece lentamente debido a que necesita un periodo de adaptación al medio; exponencial, en la que crece rápidamente debido a que tiene gran cantidad de nutrientes disponibles en el medio; y estacionaria, en la que ha alcanzado su concentración máxima por el agotamiento de nutrientes y la cantidad de biomasa permanece constante en el tiempo hasta que la población comienza a disminuir, aunque nunca se llega a este punto-.

Este modo de operación implica cambios fisiológicos en la población a medida que transcurren las diferentes fases; por ello, no suele ser empleada como modo de operación para producción de biomasa microalgal. En cambio, sí es el modo de cultivo utilizado para el estudio de la cinética de crecimiento, puesto que hace que sea fácil el cálculo de los diferentes parámetros cinéticos. De hecho, en el apartado 6.2 de la memoria del presente TFG, en el que estudia la cinética de crecimiento de *Anabaena sp.*, el modo de trabajo utilizado es este.

- 2) Cultivo semicontinuo: es una modificación del modo discontinuo, en el que no se cosecha todo el volumen del cultivo, sino tan solo una parte, justo antes de que se haya alcanzado la fase estacionaria (permaneciendo todavía en fase exponencial de crecimiento). El volumen de cultivo cosechado es reemplazado por medio de cultivo fresco, de manera que el microorganismo continúa en dicha fase de crecimiento. Esto no puede realizarse indefinidamente en el tiempo debido al envejecimiento celular. Este tipo de operación, combina las ventajas de la alta productividad del cultivo en discontinuo con la facilidad de operación de un cultivo en continuo, pues no se requiere un suministro diario de inóculo
- 3) Cultivo continuo: con este modo de operación también se mantiene al cultivo en fase exponencial de manera prolongada en el tiempo, ya que se trabaja con un caudal de entrada con medio de cultivo y otro igual, pero de salida, en el que hay biomasa (la biomasa que sale es igual a la generada). Gracias a esto, los nutrientes

se añaden en la misma cantidad en la que son retirados (por su salida del biorreactor o por su consumo por parte de los microorganismos) y los parámetros cinéticos de crecimiento y la concentración total de biomasa permanecen constantes en el tiempo. En este modo de operación es muy importante evitar que se produzca el lavado del biorreactor, es decir, que toda la biomasa presente en él, abandone el reactor a través del conducto de salida.

Anexo VII- Cultivo de microalgas

Los fotobiorreactores son los equipos destinados al cultivo masivo de microalgas. Para ello, tienen que mantener un medio estable (temperatura, pH, baja concentración de O₂) y proporcionar los nutrientes necesarios para el crecimiento incluyendo la luz, de ahí el nombre fotobiorreactor (de acuerdo a lo comentado en el *Anexo VI* y teniendo en cuenta que cada microalga se comporta de una manera diferente).

Los fotobiorreactores son un grupo importante y muy característico de reactores, que son aquellos equipos en los que se lleva a cabo cualquier reacción. La palabra que los denomina está compuesta por dos prefijos griegos: foto (luz) y bio (vida); con lo cual se alude al hecho de que son reactores que están expuestos a la luz para hacer crecer en su interior organismos que realizan la fotosíntesis y, por tanto, precisan de ella.

Autores como (Doran, 1998) o (Contreras et al., 2003) recomiendan las siguientes consideraciones a la hora de diseñar un fotobiorreactor:

- La trayectoria de la luz debe ser pequeña, con el fin de que pueda llegar a todo el volumen del cultivo.
- Mantener una alta densidad celular.
- Necesidad de un mezclado continuo para asegurar ciclos de recirculación en el interior del reactor con una frecuencia elevada y garantizar así, la homogeneidad de todo el cultivo y una exposición lumínica similar para todas las células.
- Usar tramos cortos de tubería (no más de 20 o 30 metros) para evitar así la inhibición del crecimiento por acumulación de oxígeno.
- Evitar la acumulación de sustancias inhibitorias.
- Mantener temperatura y pH óptimos en todo el volumen de cultivo.

Diseñar, escoger y utilizar un fotobiorreactor adecuado para cianobacterias es un punto clave para su cultivo, ya que poder lograr una alta productividad permitirá que los rendimientos de biomasa, metabolitos primarios y secundarios de interés, puedan ser altos y con relativamente alta especificidad para su obtención a mediana y gran escala.

Sistemas abiertos y cerrados

A la hora de diseñar un fotobiorreactor, hay un primer criterio que divide los reactores en dos grandes grupos, los sistemas abiertos y los cerrados:

- Biorreactores abiertos: en ellos, el cultivo está en contacto directo con la atmósfera. Son instalaciones que intentan compensar con un bajo coste, una baja productividad debida a un control poco estricto de las condiciones de operación, como el pH o la temperatura, ya que están completamente sujetos a las condiciones meteorológicas. Al estar abiertos al aire exterior, son susceptibles a la contaminación por otros microorganismos, por lo que son especialmente adecuados para especies de microalgas que sean difíciles de invadir. Sin embargo, pese a estos inconvenientes, la mayoría de las microalgas producidas en el mundo provienen de este tipo de sistemas. Su gran ventaja es que es fácil y económico construirlos de grandes dimensiones. Además del alto riesgo de contaminación, presentan una baja transferencia gas líquido y altas pérdidas de agua por evaporación.
- Biorreactores cerrados: reciben este nombre, porque a diferencia de los abiertos, mantienen el cultivo completamente aislado del exterior mediante una barrera física, de manera que no pueden sufrir contaminación alguna por agentes externos. Estos fotobiorreactores específicos están mucho más especializados que los abiertos, e incluso pueden llegar a estar diseñados para una especie en concreto. Presentan las siguientes ventajas frente a los sistemas abiertos:
 - ❖ Minimizan el riesgo de contaminación.
 - ❖ Mejoran la transferencia de materia.
 - ❖ Mejoran el control de las condiciones de cultivo (pH, temperatura, concentración de CO₂...).
 - ❖ No hay pérdidas de agua por evaporación.
 - ❖ Se obtienen concentraciones más elevadas de biomasa con elevada productividad.

Los reactores abiertos priman la economía aceptando un control pobre del entorno, mientras que los fotobiorreactores cerrados consiguen unas condiciones estrechamente controladas que permiten a las microalgas crecer a una velocidad óptima a cambio de un mayor coste.

Selección

Considerando esta primera división entre reactores y abiertos y cerrado, se ha creído oportuno que para este proceso de producción son más adecuados los fotobiorreactores cerrados a pesar de ser más caros y costosos.

El principal motivo reside en que es de gran importancia que nuestro cultivo final sea puro, ya que la especie de cianobacteria con la que se trabaja, *Anabaena sp.*, tiene unas características muy particulares en cuanto a la producción de micosporinas, siendo este un factor clave a la hora de llevar a cabo este proceso.

Cualquier contaminación que pudiera ocurrir y desplazara a nuestra especie en cuestión, haría que el resultado final del proceso fuera, en un alto grado de probabilidad, peor que el esperado. Esto es debido a que no todas las microalgas producen este compuesto, siendo *Anabaena sp.* una de las principales productoras y una de las pocas que se ha comprobado que aumenta su producción de micosporinas cuando se ve sometida a condiciones de estrés por radiación UVB.

Si el objetivo real del proceso en sí, fuera la obtención de biomasa microalgal, sin una aplicación excesivamente específica, los reactores abiertos serían más rentables y una opción muy a tener en cuenta; pero, en este caso, al necesitar que nuestro cultivo produzca la cantidad adecuada de MAAs, es de vital importancia, que no sea invadido por otras especies con una producción de MAAs muy inferior; es decir, es de especial importancia el hecho de tener un monocultivo. Además, no se ha estudiado aún el comportamiento de *Anabaena sp.* frente a otras especies de microalgas, por lo que en caso de invasión podrían desplazarla y acabar con la población de nuestro género de interés. Por este motivo, no se puede correr el riesgo de que suceda una contaminación.

Fotobiorreactores cerrados

Dentro de este grupo de reactores, que son los más adecuados para nuestro proceso, encontramos los siguientes tres tipos:

- **Columnas:** como bien su nombre indica, son unos fotobiorreactores cerrados que consisten básicamente en una columna con burbujeo con entrada de aire por su base y construida con un material transparente, normalmente un plástico rígido o vidrio, que permite el paso de la luz. Este tipo de fotobiorreactor presenta la principal ventaja de que las columnas son fáciles de construir ya que su forma cilíndrica ayuda a distribuir la luz y soporta bien la presión en la base, por lo que presentan una alta estabilidad. Como se ha dicho, son agitadas por aireación desde su base, lo que además de mezcla y homogeneización, provoca la desorción del O_2 disuelto y el aporte de CO_2 para que las microalgas puedan realizar la fotosíntesis. La salida de los gases se produce por la parte superior de la columna. El principal problema que presentan es su escalado, es decir, aumento de dimensiones, por lo que resulta muy complicado, o incluso inviable, construirlas de un gran volumen. El aumento de diámetro implica que no pueda llegar la luz a todo el volumen del cultivo. Tampoco es posible hacerlas de una gran altura, ya que la base se vería sometida a una presión muy elevada, lo que dificulta el burbujeo y causa estrés hidrodinámico (dando por descontado, que sería muy incómodo operar con ellas si son excesivamente altas).

Dentro de este grupo, existe una variante a las columnas de burbujeo, que son los reactores airlift, los cuales tienen el fotobiorreactor dividido en dos zonas interconectadas. Una es la zona ascendente, donde la mezcla de gases es burbujeada; y la zona descendente, donde no existe burbujeo. Las burbujas hacen que el cultivo también ascienda, siendo su descenso por la parte en la que no hay burbujas, favoreciendo así el movimiento del cultivo y una correcta homogeneización.

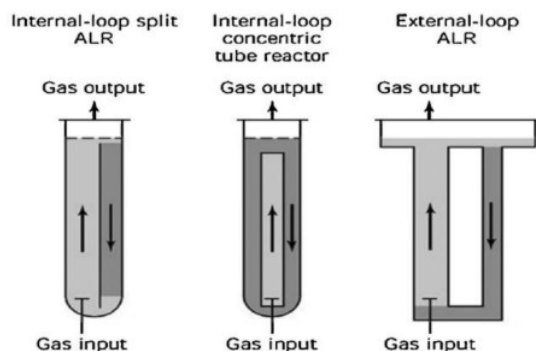


Figura A7- Ejemplos de fotobiorreactores tipo airlift

- Reactores planos (*Flat panels*): son muy parecidos a las columnas en su filosofía de diseño, ya que tanto la agitación como el intercambio de materia se producen en el mismo espacio. Están formados por dos láminas transparentes, normalmente de vidrio, o de algún plástico rígido. Pueden considerarse una modificación de las columnas de burbujeo, ya que intentan solucionar los problemas que estas presentan:

- a) El paso óptico se puede hacer tan delgado como se quiera, es decir, los paneles pueden ser tan estrechos como se desee hasta alcanzar el óptimo. De esta manera, la luz llegará de manera eficiente a todo el volumen de cultivo. Con, a su vez, el inconveniente de que, a menor paso óptico, menor volumen del fotobiorreactor.
- b) Estos biorreactores, a diferencia de las columnas de burbujeo, pueden escalarse fácilmente, ya que solo hay que aumentar su longitud, sin variar su altura ni el paso óptico.
- c) Se pueden construir inclinados y es posible orientarlos hacia el sol, para maximizar así la captación de luz y con ello la productividad.

Aunque de manera teórica parece que sólo presentan ventajas, en la práctica, no es fácil construir estos fotobiorreactores planos demasiado largos, debido a la dificultad que tiene esta geometría para soportar la presión hidrostática. Además, pese a que existe la posibilidad de proporcionarles una inclinación, esto no se hace, ya que dependen del burbujeo, por lo que cualquier inclinación distorsionaría este modo de aireación y homogeneización.

- Reactores tubulares: este último tipo de fotobiorreactores son los más especializados y, a su vez, lo más difíciles de construir y diseñar. Sin embargo, es el tipo de fotobiorreactor más empleado a escala industrial, debido a su muy fácil escalado. Están formados por haces de tubos horizontales conectados como un sistema de tuberías, por los cuales circula el cultivo. Por ello, su escalado es tan simple como aumentar el número de tubos o su longitud. Al igual que para los otros tipos de fotobiorreactores, los tubos se suelen fabricar de plásticos transparentes o vidrio de borosilicato. El diseño de esta clase de fotobiorreactores implica dos partes claramente diferenciadas:

- Desgasificador: en esta parte se produce el intercambio de materia, principalmente la desorción de O_2 y la absorción de CO_2 y los

intercambios térmicos a través de cambiadores de calor que se pueden instalar al efecto.

- Lazo: en esta zona se lleva a cabo la captación de la energía solar. Recibe este nombre debido a la presencia de codos y curvas para adquirir una forma compacta y ocupar poco espacio. El lazo está específicamente diseñado para la captación de la luz, lo que permite optimizar la productividad maximizando la eficiencia fotosintética, en caso de que no exista el fenómeno de fotoinhibición. Dichos tubos pueden encontrarse de manera vertical, horizontal o inclinada.

Las principales desventajas que tienen este tipo de sistema de cultivo son la dificultad para controlar la temperatura y la acumulación del oxígeno fotosintético.

Selección

Teniendo en cuenta todo lo comentado anteriormente y buscando que nuestro proceso de producción sea, además de económico y eficaz, lo más parecido posible a cómo se llevó a cabo a escala de laboratorio, queda como opción más alejada de los que se busca el reactor plano (flat panel), quedándonos por tanto la posibilidad de utilizar un reactor de columna o uno tubular horizontal.

Como estamos buscando que el modo de trabajo sea similar al llevado a cabo en el laboratorio y teniendo en cuenta las consideraciones que implica un volumen mucho más elevado de cultivo, el reactor en columna es la opción elegida, ya que es fácil de operar y se obtiene una buena productividad, siempre y cuando se tenga en cuenta que un diámetro elevado impide el paso de la luz.

Además, aunque los resultados en los fotobiorreactores tubulares pueden ser un tanto mejor, los verticales son muy económicos, lo cual siempre es un factor muy importante, y muchas veces limitante, a tener en cuenta en todo proceso industrial.

Fotobiorreactores de columna

Dentro de este grupo encontramos dos tipos de fotobiorreactores, las columnas de burbujeo y los fotobiorreactores airlift.

En ambos tipos de fotobiorreactores son columnas en las que se burbujea aire desde la base, pero se diferencian en el hecho de que en los fotobiorreactores tipo airlift, las corrientes de flujo ascendentes están separadas físicamente de las descendentes por una barrera. Por ese motivo, los reactores airlift cuentan con varias estructuras bien definidas:

- Columna de burbujeo (riser o upflow): guía las burbujas hacia la parte superior de la columna. En ella, el flujo es ascendente.
- Columna de flujo descendente (downcomer o downflow): como su nombre indica, en esta parte se establece un flujo descendente debido a una mayor densidad aparente que en el riser, ya que no hay burbujas.
- Zona de separación de gases: ubicada en el extremo superior del reactor; es el lugar donde ocurre la separación de las burbujas que llegan por el riser y se produce en dicha zona la unión con el downcomer.
- Base: es la parte inferior del reactor, donde se unen, una vez más, el riser y el downcomer. En esta parte se introducen las burbujas por el riser gracias a la presencia de un difusor.

La principal ventaja de este sistema frente a las columnas de burbujeo es que, con esta configuración, se crea un patrón de circulación de mezclado donde el medio líquido pasa continuamente de las zonas oscuras a las zonas iluminadas creando un efecto de intermitencia de luz (Barbosa et al., 2003). Este efecto se produce cuando la fase líquida se eleva en la zona donde el gas es inyectado y desciende en la otra zona. Gracias a esto, las células son transportadas en el flujo líquido-gas experimentando así, una irradiación regular y periódica.

Además de lo citado, podemos considerar que los fotobiorreactores tipo airlift poseen numerosas ventajas:

- Presentan débiles fuerzas de cizalla en su interior al remplazar la agitación mecánica por una neumática. Esta cualidad ha sido aprovechada para cultivar células o tejidos frágiles que sufren procesos de lisis celular en reactores con agitación mecánica.

- Su diseño no involucra ejes o motores eléctricos, por lo que su construcción es sencilla, robusta, de fácil mantenimiento y gran eficiencia energética.
- El burbujeo de aire, a través del medio líquido, facilita la transferencia de masa, enriqueciendo el medio con algún gas o, por lo contrario, despojándolo de gases residuales de reacción, como es el O₂ producido en la fotosíntesis.
- A igualdad de aire burbujeado y de sección transversal, los reactores airlift presentan, frente a las columnas de burbujeo, mayores velocidades superficiales de líquido, logrando mejores mezclados.

Por otro lado, los reactores airlift no son recomendables cuando el medio de cultivo es muy viscoso o contiene partículas sólidas muy densas, pero no es este nuestro caso.

Selección

Por todo lo expuesto, con sus ventajas en inconvenientes, considero que los reactores de columna tipo airlift son los más adecuados de cara al proceso que se ha de llevar a cabo, ya que permiten simular lo realizado en el laboratorio, pero a una mayor escala e impidiendo la contaminación por parte de otros microorganismos al ser un fotobiorreactor cerrado

Anexo VIII- Cálculos de intensidades luminosas

La intensidad luminosa que recibe el cultivo es un factor clave a la hora de establecer el lugar donde se van a encontrar estos, ya que se ha observado que existe un posible efecto de fotoinhibición.

La intensidad lumínica de radiación fotosintéticamente activa, PAR, con la que se trabajó a escala de laboratorio es de $119 \mu\text{moles} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Se procede a calcular la radiación PAR anual que hay en diferentes localizaciones geográficas con el fin de compararla con la utilizada experimentalmente. Los datos de radiación son obtenidos del Photovoltaic Geographical Information System, de la Comisión Europea. El último año del que se aporta la información es del 2016, considerando completamente extrapolables los resultados obtenidos en dicho año, a la actualidad.

En Cádiz, el cálculo de la radiación PAR desglosada por meses, a lo largo del 2016, se presenta en la siguiente tabla:

| | $H_h \text{ kWh m}^{-2} \text{ mes}^{-1}$ | $H_h \text{ Wh m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ | $H_h \text{ W m}^{-2}$ | $I_{in} (\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1})$ |
|-------------------|---|--|--|--|
| <i>Enero</i> | 110 | 3666,67 | 152,78 | 279,28 |
| <i>Febrero</i> | 128 | 4266,67 | 177,78 | 324,98 |
| <i>Marzo</i> | 239 | 7966,67 | 331,94 | 606,79 |
| <i>Abril</i> | 188 | 6266,67 | 261,11 | 477,31 |
| <i>Mayo</i> | 244 | 8133,33 | 338,89 | 619,49 |
| <i>Junio</i> | 293 | 9766,67 | 406,94 | 743,89 |
| <i>Julio</i> | 291 | 9700,00 | 404,17 | 738,82 |
| <i>Agosto</i> | 274 | 9133,33 | 380,56 | 695,66 |
| <i>Septiembre</i> | 239 | 7966,67 | 331,94 | 606,79 |
| <i>Octubre</i> | 170 | 5666,67 | 236,11 | 431,61 |
| <i>Noviembre</i> | 129 | 4300,00 | 179,17 | 327,52 |
| <i>Diciembre</i> | 131 | 4366,67 | 181,94 | 332,59 |

Tabla A69- Radiación PAR en Cádiz en 2016

La primera columna contiene los datos proporcionados con la radiación total mensual en $\text{kWh} \cdot \text{m}^{-2}$. A partir de ese dato, en la segunda columna aparece calculada la irradiancia diaria en W. En la tercera columna se calcula la irradiancia por hora del día, con el fin de hallar un promedio. Por último, se calcula la irradiancia en micromoles de fotones correspondientes a la radiación fotosintéticamente activa, que es el 40% de la total.

La irradiancia promedio en Cádiz a lo largo de un año es de $515,39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, muy superior a la utilizada en el laboratorio.

Se ha decidido estudiar la intensidad de la radiación en otra localización, mucho más al norte, concretamente en Praga, con el fin de analizar brevemente su variación con la latitud. Los datos obtenidos en este caso se muestran en la siguiente tabla:

| | $H_h \text{ kWh mes}^{-1}$ | $H_h \text{ Wh m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ | $H_h \text{ W m}^{-2}$ | $I_{in} (\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})$ |
|-------------------|----------------------------|--|------------------------|---|
| <i>Enero</i> | 22,8 | 760 | 31,7 | 57,9 |
| <i>Febrero</i> | 40,8 | 1360 | 56,7 | 103,6 |
| <i>Marzo</i> | 73,9 | 2463,33 | 102,6 | 187,6 |
| <i>Abril</i> | 117 | 3900 | 162,5 | 297,1 |
| <i>Mayo</i> | 160 | 5333,33 | 222,2 | 406,2 |
| <i>Junio</i> | 160 | 5333,33 | 222,2 | 406,2 |
| <i>Julio</i> | 164 | 5466,67 | 227,8 | 416,4 |
| <i>Agosto</i> | 146 | 4866,67 | 202,8 | 370,7 |
| <i>Septiembre</i> | 112 | 3733,33 | 155,6 | 284,4 |
| <i>Octubre</i> | 52,6 | 1753,33 | 73,1 | 133,5 |
| <i>Noviembre</i> | 29,6 | 986,67 | 41,1 | 75,2 |
| <i>Diciembre</i> | 19,6 | 653,33 | 27,2 | 49,8 |

Tabla A70- Radiación PAR en Praga en el año 2016

La irradiancia promedio, en este caso, es de $232,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, también muy superior al caso estudiado.

Debido a que la radiación PAR del Sol es muy superior a la utilizada en el laboratorio y no es conveniente utilizar una radiación PAR mayor a la utilizada debido al posible efecto de fotoinhibición, se considerará que los fotobiorreactores han de estar en el interior de la nave que constituye la planta piloto, de manera que se pueda controlar la radiación PAR incidente sobre estos, evitando así que se produzcan efectos de fotoinhibición.

Anexo IX- Dimensiones del fotobiorreactor

Para el diseño de un fotobiorreactor (Tsoglin et al., 1996) propuso tener en cuenta los siguientes enunciados:

- ✓ El fotobiorreactor debe permitir el cultivo de varias especies de algas.
- ✓ El diseño debe proveer la iluminación suficiente sobre la superficie del fotobiorreactor y una rápida velocidad de transferencia de masa de CO₂ y de O₂.
- ✓ El diseño debe prevenir o minimizar el ensuciamiento, principalmente de las superficies iluminadas.
- ✓ Se deben tener altas tasas de transferencia de masa sin dañar la integridad celular o inhibir su crecimiento.
- ✓ Debe poder operar aún en condiciones de alta producción de espuma.
- ✓ Debe tener un mínimo de zonas no iluminadas, ya que estas evitan el crecimiento celular.

Centrándonos en el dimensionamiento del reactor airlift, hay que tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- Sánchez et al. (2000) indican para un fotobiorreactor tubular vertical, un diámetro de tubo no mayor a 0,2 m para que la disponibilidad de luz no se vea reducida.
- La altura debe estar comprendida entre 1 y 4 metros
- Tabla que se muestra a continuación:

| Referencia | L_t/L_r | A_d/A_r | Fase líquida |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------------------------|
| Quintero, 1990 | 0.6-0.9 | 0.9290 | Agua |
| Chisti y Jáuregui-Haza, 2002 | 0.83 | 1.2956 | Célulosa/agua |
| Sánchez-Mirón y col., 2004 | 0.81 | 0.8261 | Agua |
| Cheng-Shing y Shyh-Jye 2004 | 0.78 | 1.2956 | Tolueno/agua |
| Mehrnia y col., 2005 | 0.9 | 1.2276 | Derivados del petróleo/agua |
| Shariati y col., 2007 | 0.74 | 0.9837 | Derivados del petróleo/agua |
| Cerri y col., 2010a | 0.80 | 1.6874 | Glicerol/agua Xantano/agua |
| Luo y Al-Dahhan, 2011 | 0.70 | 1.1626 | Agua |

Tabla A71- Relaciones geométricas de reactores airlift de tubos concéntricos escogidas por diferentes autores (Lizardi, 2011)

De la tabla mostrada, nos quedaremos con la última relación propuesta, en la que la fase líquida es agua. En el caso sobre el que trata el presente TFG, el fluido no es agua, sino medio de cultivo, y aunque su densidad es distinta a la del agua, al ser este el componente mayoritario con mucha diferencia del medio de cultivo, consideraremos que el cultivo presenta unas propiedades idénticas a las de dicho fluido.

De acuerdo al criterio seguido, propuesto por Duo y Al-Dahhan, 2011, se ha de considerar lo siguiente:

- La relación de alturas entre la de la columna de burbujeo y la del reactor es de 0,7.
- La relación de áreas del riser y el downcomer es de 1,1626.

Teniendo estos datos en cuenta, el fotobiorreactor tendrá una altura de 2 metros con un diámetro de 20 cm, de esta manera tendrá un volumen de:

$$V = \pi * \frac{D^2}{4} * h = \pi * \frac{0,2^2}{4} * 2 = 0,0628 \text{ m}^3 = 62,8 \text{ L}$$

Consideraremos un volumen efectivo de 60 L.

Por otro lado, la altura de la columna de burbujeo, a la cual llamaremos h_b , es 0,7 la altura del fluido, que es 2 metros, por lo que:

$$h_b = 2 * 0,7 = 1,4 \text{ m}$$

Para concluir, también se ha de cumplir con la segunda relación propuesta:

$$A_d/A_r = 1,1626$$

En este caso, el riser será un tubo concéntrico al cilindro que conforma el biorreactor y el downcomer, por ello, será la corona circular externa. Sus respectivas áreas serían las siguientes:

$$A_r = \pi * \frac{d_r^2}{4}; A_d = \pi * \frac{D^2 - d_r^2}{4} = \pi * \frac{0,2^2 - d_r^2}{4}$$

Operando con la relación anterior, queda lo siguiente:

$$\frac{A_d}{A_r} = 1,1626 \rightarrow \frac{\pi * \frac{0,2^2 - d_r^2}{4}}{\pi * \frac{d_r^2}{4}} = 1,1626 \rightarrow \frac{0,2^2}{d_r^2} - 1 = 1,1626 \rightarrow \frac{0,2^2}{d_r^2} = 2,1626 \rightarrow$$

$$d_r = \sqrt{\frac{0,2^2}{2,1626}} \rightarrow d_r = 0,136 \text{ m} = 13,6 \text{ cm}$$

Con todos estos datos, ya podemos conocer todas las dimensiones del reactor airlift diseñado:

| | |
|-----------------------------|---------|
| <i>Altura del reactor</i> | 2 m |
| <i>Altura del riser</i> | 1,4 m |
| <i>Diámetro del reactor</i> | 0,2 m |
| <i>Diámetro del riser</i> | 0,136 m |
| <i>Volumen útil</i> | 60 L |

Tabla A72- Dimensiones del fotobiorreactor para crecimiento

Anexo X- Número de fotobiorreactores

Calculado ya el volumen de un reactor, será necesario, por tanto, calcular el número de reactores necesarios para la producción de 25 kilogramos al año.

$$\text{Producción anual} = 25 \text{ kg microalgas}$$

Lo primero que se ha de tener en cuenta es el volumen de cultivo que se deberá tratar, para lo cual se necesita conocer la concentración máxima alcanzable por *Anabaena sp.*, la cual se ha determinado experimentalmente que se encuentra en torno a 1 g/L. Para tener un relativo margen de error en el apartado experimental, se considerará:

$$\text{Concentración máxima} = 0,9 \text{ g}_{\text{microalga}}/\text{L}$$

A partir de esos dos datos, se puede calcular el total de cultivo necesario para obtener los 25 kg de biomasa anuales.

$$\text{Volumen culti} = \frac{\text{Producción anual}}{\text{Conc. máxima}} = \frac{25000 \text{ g/año}}{0,9 \text{ g/l}} = 27778 \text{ L/año}$$

Por cualquier incidente que pueda suceder y tener margen de corrección de errores y problemas, se considerará que el volumen de trabajo anual es de 30000 L.

$$\text{Volumen de cultivo anual} = 30000 \text{ L}$$

Por otro lado, se intentará trabajar siempre con la especie en fase exponencial, para optimizar los tiempos de crecimiento y, con ello, de operación.

Experimentalmente se halló que, en las condiciones de laboratorio especificadas en el apartado 6. *Desarrollo experimental* de la memoria, la productividad, es decir, el aumento de concentración de biomasa por unidad de tiempo es:

$$\text{Productividad} = 1,5 \frac{\text{mg}}{\text{L} * \text{h}}$$

Se cree que el estudio de la cinética no fue realizado en las condiciones más óptimas de luminosidad, ya que existen evidencias de que la especie marina no lo estaba, pero se desconoce también si la especie continental, pese a que respondió relativamente bien a esa intensidad lumínica, crece más rápido con una menor radiación. A pesar de ello, al ser el dato medido, es el que utilizaremos para los cálculos.

Al trabajar en semicontinuo, parte del volumen de cultivo del reactor permanecerá en el fotobiorreactor, cosechándose solo una parte. Se ha decidido que el volumen a retirar de cada reactor sea 2/3 del volumen total, es decir, 40 L. Dicho volumen será repuesto con medio de cultivo fresco.

Esto implica que la concentración de microalga, tras haber renovado el medio de cultivo, será 1/3 de la que había antes de cosechar los 40 L del fotobiorreactor y añadir nuevo medio de cultivo. Por este motivo, la concentración inicial tras cada renovación será de:

$$\text{Concentración inicial} = 0,3 \text{ g/L}$$

Se ha de calcular el tiempo que tardará en aumentar la concentración hasta su valor máximo, es decir, de 0,9 g/L. Esto supone un aumento de la concentración de 0,6 g/L. Para el cálculo del tiempo necesario, al cual podemos denominar tiempo de residencia, utilizaremos el dato de la productividad.

$$\text{tiempo de residencia} = \frac{\Delta \text{Concentración}}{\text{Productividad}} = \frac{0,6 \frac{\text{g}}{\text{L}} = 600 \text{ mg/L}}{1,5 \text{ mg/(L * h)}} = 400 \text{ horas}$$

Dichas 400 horas, equivalen a 17 días aproximadamente. De esta manera, puede asumirse que, entre renovación y renovación del medio de cultivo, transcurrirán 17 días, que es lo que tarda *Anabaena sp.* en llegar a la concentración deseada. Se ha de considerar que las microalgas necesitan luz para poder realizar la fotosíntesis, luego sólo aumentarán su biomasa en presencia de esta. Sin embargo, de acuerdo a lo estimado en el *Anexo VIII*, tendrán iluminación artificial constante todo el tiempo. Esto implica que cada reactor, a lo largo de un año puede realizar:

$$\text{número de ciclos} = \frac{365 \text{ días /año}}{17 \text{ días /ciclo}} = 21,5 \text{ ciclos}$$

Considerando el tiempo en el que el cultivo no se encuentre en fase exponencial y cualquier otro inconveniente que pueda surgir, se estima que cada reactor operará un total de 20 ciclos en un año.

Al ser cosechado en cada ciclo un volumen de 40 L, cada reactor operará cada año un volumen total de:

$$40 \frac{\text{L}}{\text{ciclo}} * 20 \frac{\text{ciclos}}{\text{años}} = 800 \frac{\text{L}}{\text{año}}$$

Sabiendo el volumen de cultivo que cada reactor operará a lo largo de un año y el volumen necesario para obtener los 25 kg anuales estimado, se puede calcular de manera directa el número de fotobiorreactores con los que contará la planta.

$$\text{Número de reactores} = \frac{\text{Volumen total cultivo}}{\text{Volumen para un reactor}} = \frac{30000 \text{ L}}{800 \text{ L}} = 37,5 \text{ reactores}$$

Esto es, necesitaremos un total de 38 reactores como el propuesto.

El total de reactores se dispondrá en cuatro filas de diez reactores, habiendo en la primera y en la tercera fila 10 fotobiorreactores en cada una de ellas, y en la segunda y en la cuarta fila, habrá nueve en cada una de ellas, haciendo así el total de 38 fotobiorreactores. Los fotobiorreactores estarán separados entre sí una distancia de 30 cm, siendo el espacio total ocupado por cada fila de:

$$0,2 \text{ metros} * 10 \text{ reactores} + 0,3 \text{ metros} * 9 \text{ espacios} = 4,7 \text{ m}$$

Esta disposición puede observarse en el Plano 1.

Anexo XI- Materiales de los fotobiorreactores

Los avances en la ingeniería de los materiales han multiplicado, en los últimos años, las opciones a la hora de escoger un material para cumplir con las especificaciones que requiere cualquier aplicación. A la hora de la elección de cualquier material es importante tener en cuenta, entre otros, los siguientes aspectos:

- Temperatura a la que se verá sometido el material.
- Cualidades ópticas del material.
- Si estará en contacto con sustancias corrosivas o con las que pueda reaccionar.
- Si el material debe ser impermeable o resistente al agua.
- Si puede verse afectado por alguna fuerza que pueda deformarlo.
- Si es indispensable que deje pasar la luz, o por el contrario, que deba impedir el paso de la radiación.

En el caso de los fotobiorreactores, partiendo de la base de que han de ser impermeables, se persigue la utilización de materiales que dejen pasar la mayor cantidad de luz posible, a excepción de que el foco de luz sea interno al reactor, lo cual no es el caso.

El material debe ser, entonces, transparente o translúcido; descartando así los materiales opacos. Los vidrios (que se incluyen dentro de los materiales cerámicos) y los polímeros ofrecen una amplia variedad de materiales distintos que presentan transparencia. Además de esta calidad, el material de construcción de un fotobiorreactor ha de tener las siguientes características:

- Resistencia e impermeabilidad al agua y no verse dañado por los medios salinos.
- Ser inerte a los productos de limpieza empleado en biorreactores, tales como soluciones de hipoclorito de sodio o de ácido clorhídrico.
- Resistencia a la presión ejercida por el cultivo en su interior.
- La superficie ha de ser lisa para evitar la incrustación de microorganismos en los poros, ya que se acumularían en dichas zonas.
- Ser fotoestables, es decir, no verse afectados por la luz solar.
- La radiación UV no debe alterar tampoco sus propiedades.

A continuación, se presenta una tabla en la que se recogen diferentes materiales transparentes que pueden ser utilizados para el diseño del fotobiorreactor con sus principales características.

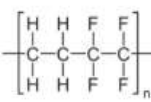
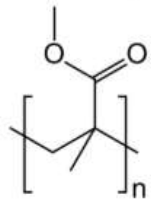
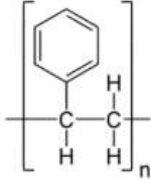
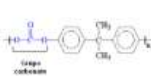

| Nombre | Características | Usos | Molécula |
|----------------------------------|---|--|---|
| etileno-tetrafluoretileno (ETFE) | transmisión de la luz del 95 %, resistencia rayos ultravioleta, al calor, química y mecánica, | Páneles para construcción arquitectónicas. |  |
| polimetilmetacrilato (PMMA) | Transparencia del 93 %, alta resistencia al impacto, dureza similar al del aluminio, bajo peso (1 190 kg/m ³) | Cristales para gafas, lupas, duchas, vajillas, paneles luminosos, peceras, tapas |  |
| poliestireno (PS) | El poliestireno cristal es un polímero duro y quebradizo. | Cajas de chocolates, desodorantes |  |
| policarbonato (PC) | Los policarbonatos son un grupo de termoplasticos ampliamente utilizados. | CDs, faros de autos, tapas luminarias, mirillas |  |
| polietileno tereftalato (PET). | Liviano, resistente a ácidos, muy buena barrera de CO ₂ . | Envases de bebidas y aceites. |  |
| vidrio | Muy estable pero pesado (2,2 g/cm ³) | Envases, ventanas, instrumentos de laboratorio | |

Figura A8- Materiales transparentes empleados en industria

Anexo XII- Fotobiorreactor para el estresado celular

El estresado de las microalgas se realiza una vez se haya alcanzado la cantidad de biomasa adecuada y persigue el fin de estimular la producción de MAAs, que son los compuestos presentes en *Anabaena sp.* cuya función es absorber la radiación UV del Sol, evitando así que sea dañina para el microorganismo. Este estresado es realizado, ya que hay estudios que demuestran que las cianobacterias del género *Anabaena sp.*, aumentan su producción de MAAs cuando se ven sometidas a UVB, obteniendo resultados positivos en la fase experimental. Además, como se ha comentado en el apartado 5-*Antecedentes* de la memoria, tienen otras propiedades, tales como antioxidantes y antiinflamatorias, beneficiosas para el organismo.

Para realizar el estresado, el volumen de cultivo cosechado de cada fotobiorreactor se transferirá a otro fotobiorreactor. Este equipo tendrá un volumen de 40 L, es decir, igual al volumen cosechado de cada fotobiorreactor para el crecimiento. Este biorreactor será una columna de burbujeo con un sistema de recirculación, con el fin de que el fluido pueda pasar a través del equipo que contiene la lámpara de ultravioleta, y así producirse estresado. La salida del cultivo se producirá por la parte inferior del biorreactor y la entrada, tras haber pasado a través del equipo con la lámpara UV, por la parte superior.

Dicho biorreactor con un volumen de 40 L, tendrá una altura también de 2 metros, por lo que el cálculo de su diámetro es directo:

$$V = h * \pi * \frac{D^2}{4} = 40 \text{ L} = 0,04 \text{ m}^3 = 2 * \pi * \frac{D^2}{4} \rightarrow D = 0,159 \text{ m}$$

Estos fotobiorreactores se verán sometidos a las mismas condiciones de temperatura y luminosidad que los destinados al crecimiento.

Anexo XIII- Equipo destinado al estresado celular

Es importante recordar que, en la parte experimental, se han obtenido las siguientes conclusiones en lo que al estresado se refiere:

- Caudales de trabajo bajos nos proporcionan mejores resultados en cuanto a lo que la producción de MAAs se refiere. Esto implica un tiempo continuado de exposición más elevado a la luz UV, pero más distanciado con la siguiente vez que sea expuesto a dicha radiación.
- No se observa diferencia en la producción de MAAs para las dos dosis aplicadas.

Por ello, se considerará que la dosis de trabajo ha de estar comprendida en el rango que se encuentra entre las dos dosis aplicadas en la fase experimental, entre 25,92 y 51,84 kJ, e igualmente distribuidas a lo largo del tiempo.

Por otro lado, la lámpara UV que se empleará en la planta piloto no será el mismo modelo que el utilizado en el laboratorio, debido a las pequeñas dimensiones de esta. Ambos modelos pertenecen al grupo de lámparas UV-B Narrowband PL-L/PL-S de la compañía Philips. Al ser el mismo tipo de lámparas, las características fotométricas que presentan los dos modelos son idénticas. Ambas emiten en un estrecho rango del UVB comprendido entre los 305 y 315 nm de longitud de onda, con un máximo de emisión a los 311 nm.

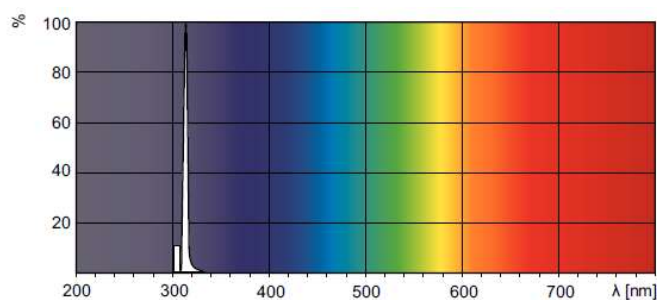


Figura A9- Espectro de emisión de las lámparas UVB usadas para el estresado celular

En cambio, al ser modelos diferentes, aunque las características de emisión sean idénticas, los dos equipos varían ligeramente uno del otro. Dichos dos modelos son:

- El modelo de la lámpara empleada en el laboratorio PL-S 9W/01/2P 1CT/6X10BOX.
- El modelo de la lámpara que será empleada en la planta piloto es PL-L 36W/01/4P 1CT/25.

Las características de dichos modelos se recogen en la siguiente tabla:

| | PL-S 9W/01/2P 1CT/6X10BOX | PL-L 36W/01/4P 1CT/25 |
|---------------------------------|------------------------------|-----------------------|
| General information | | |
| Cap-Base | 2G7 [2G7] | 2G11 [2G11] |
| Main Application | Phototherapy systems | Phototherapy systems |
| Life to 50% Failures (Nom) | 1000 h | 2000 h |
| Light Technical | | |
| Color Code | 01 | 01 |
| Color Designation | Ultra Violet B | Ultra Violet B |
| UV Depreciation at 1000 h | 20% | 20% |
| Operating and Electrical | | |
| Power (Rated) (Nom) | 8.0 W | 36 W |
| Lamp Current (Nom) | 0,165 A | 0,435 A |
| Voltage (Nom) | 51 V | 105 V |
| Mechanical and Housing | | |
| Cap-Base Information | 4 Pins | 4 Pins |
| UV | | |
| UV-B Radiation 100 hr (IEC) | 1.0 W | 4.8 W |
| Product Data | | |
| Full product code | 871869659672200 | 871869666113000 |
| Order product name | PL-S 9W/01/2P 1CT/6X10BOX | PL-L 36W/01/4P 1CT/25 |
| EAN/UPC-Product | 8718696596722 | 8718696661130 |
| Order code | 927912900121 | 927903400151 |
| Numerator-Quantity Per Pack | 1 | 1 |
| Numerator-Packs per outer box | 60 | 25 |
| Material Nr. (12NC) | 927912900121 | 927903400151 |
| Net Weight (Piece) | 30,000 g | 104,000 g |

Tabla A73- Datos técnicos de las lámparas UVB destinadas al estresado celular

Las dimensiones de los equipos vienen recogidas en las siguientes imágenes:



Figura A10- Dimensiones de la lámpara UVB utilizada a escala de planta piloto



Figura A11- Dimensiones de la lámpara UVB utilizada a escala laboratorio

Las diferencias de ambos modelos que afectarán al escalamiento son las siguientes:

| Característica de la lámpara UV | Lámpara UV empleada en el laboratorio | Lámpara UV empleada a escala de planta piloto |
|---------------------------------|---------------------------------------|---|
| Potencia de emisión (W) | 1 | 4,8 |
| Longitud (cm) | 14,5 | 41 |
| Diámetro (cm) | 2,8 | 3,9 |

Tabla A74- Características de interés de las dos lámparas UVB

Para calcular la dosis a la que se ve sometido el cultivo, es necesario conocer tanto el volumen del cultivo como el volumen de fluido capaz de contener el equipo en el que se encuentra la lámpara UV. Al tener la lámpara empleada en el escalamiento del proceso unas mayores dimensiones, es necesario estimar dicho volumen.

Este volumen se calcula a partir de los datos del equipo empleado en el laboratorio. De dicho equipo, conocemos:

- El volumen total del equipo empleado, con una longitud de 20 cm y un diámetro de 6 cm, es de 565 mL ($1 \text{ mL} = 1 \text{ cm}^3$)
- El volumen de la lámpara, conocido gracias a las dimensiones que vienen especificadas en la ficha del modelo, es de 90 mL.
- El volumen de fluido que cabe en el interior del equipo es de 190 mL.

Por tanto, la diferencia de volúmenes, que consideraremos el volumen perdido, será únicamente el volumen que ocupa la cubierta del equipo, es decir, el volumen relacionado con el espesor de esta. Para el cálculo del espesor, asumimos que el equipo es un cilindro hueco, cuyo volumen es:

$$V_{\text{cubierta}} = V_{\text{total}} - V_{\text{lámpara}} - V_{\text{flui}} = 565 - 90 - 190 = 285 \text{ cm}^3$$

Con todos estos datos podemos calcular el diámetro interno del cilindro hueco, ya que conocemos su longitud, su diámetro externo y su volumen:

$$V = \pi * \frac{D_e^2 - D_i^2}{4} * L \rightarrow 285 = \pi * \frac{6^2 - D_i^2}{4} * 20 \rightarrow D_i = 4,2 \text{ cm}$$

La diferencia del diámetro externo y el diámetro interno es, por tanto, dos veces el espesor de la cubierta. Con todo esto, se ha hallado que el grosor de la cubierta del equipo es de 0,9 cm aproximadamente. A continuación, podemos calcular la distancia que hay entre la lámpara y la cubierta teniendo en cuenta que, al ser cilindros concéntricos, la distancia será la mitad de la total hallada.

$$distancia = (D_{equipo} - D_{lámpara} - 2 * espesor) / 2 = 6 - 2,8 - 2 * 0,9 = 0,7 \text{ cm}$$

Luego, por cada lado, la lámpara se distanciara del equipo un espacio de 0,7 cm. Sabiendo este dato y conociendo las dimensiones del equipo nuevo, podemos calcular de una manera aproximada el volumen de fluido que cabe en el interior de este modelo.

Para ello, se estimará el volumen de un cilindro hueco con diámetro interno igual al diámetro de la lámpara y espesor de 0,7 cm. Para este cálculo, se asume que, al ser los equipos proporcionados por la misma compañía, la distancia entre lámpara y cubierta del equipo será la misma (0,7 cm).

$$V = \pi * \frac{D_e^2 - D_i^2}{4} * L \rightarrow V = \pi * \frac{5,3^2 - 3,9^2}{4} * 46,5 \rightarrow V = 470 \text{ cm}^3 = 470 \text{ mL}$$

Operando, se llega a que dentro de este equipo cabrá un volumen de fluido igual a 0,47 L

De esta manera, la dosis aplicada será:

$$Dosis = P * \frac{V_{equipo}}{V_{fluido}} * t = 4,8 * \frac{0,47 \text{ L}}{40 \text{ L}} * 72 * 3600 = 14,62 \text{ kJ}$$

Esta dosis es inferior a la aplicada en la fase de laboratorio, luego se utilizarán dos equipos de estresado colocados en serie, de modo que se considerará un volumen de 0,94 L. A este volumen equivale la siguiente dosis.

$$Dosis = 4,8 * \frac{0,94}{40} * 72 * 3600 = 29,24 \text{ kJ}$$

Al encontrarse esta dosis en el rango comprendido entre los valores aplicados a escala de laboratorio, con los que han sido obtenidos valores similares, este sistema de estresado se ajusta a lo necesitado.

También es importante tener en cuenta que el caudal ha de ser proporcional al volumen de cultivo para que la dosis aplicada sea la misma.

A escala de laboratorio se encontró que el caudal más adecuado era el de 3,525 L/h cuando el volumen de cultivo era de 0,95 y 1,9 L. Para los cálculos utilizaremos un volumen promedio:

$$V = \frac{0,95 + 1,9}{2} = 1,425 \text{ L}$$

Y con una simple proporcionalidad entre caudal y volumen, se puede hallar el caudal de trabajo necesario en el proceso:

$$\text{Caudal} = 3,525 \frac{\text{L}}{\text{h}} * \frac{40 \text{ L}}{1,425 \text{ L}} = 99 \frac{\text{L}}{\text{h}}$$

Por ello, para la realización del estresado se precisará de una bomba que sea capaz de impulsar, al menos un caudal de 100 L/h.

Anexo XIV- Obtención de biomasa húmeda

Todas las operaciones llevadas a cabo tras el crecimiento celular reciben el nombre de downstream, y abarca a todos aquellos procesos que son necesarios para obtener la biomasa (o algún subproducto) en las condiciones deseadas.

Un buen proceso de separación y obtención de biomasa debe cumplir los siguientes requisitos:

- ✓ Asegurar la pureza deseada del producto.
- ✓ Asegurar la estabilidad del producto.
- ✓ Mantener bajos costes.
- ✓ Ser reproducible a una escala superior.
- ✓ Cumplir con la regulación vigente establecida.

En este proyecto, una vez que se ha llevado a cabo el estresado de la biomasa con el fin de estimular y aumentar la producción de MAAs por parte de *Anabaena sp.*, el siguiente objetivo es la obtención de dicha biomasa.

Un primer paso, consiste en obtención de biomasa húmeda, es decir, no tendremos solamente biomasa, sino que también incorporará algo de agua, pero se encontrará en una concentración muy elevada. Las dos principales operaciones para obtener la biomasa húmeda en una elevada concentración son:

- La filtración: es un método físico de separación sólido/fluido basado en la retención de las partículas de un tamaño superior a un valor proporcionado por una malla filtrante. Dicho valor es igual al tamaño del poro del filtro, que es lo que delimita, o no, el paso de las partículas. Los dos principales tipos de filtrado usados en la industria relacionada con microalgas son los filtros a vacío y los filtros de tambor rotatorio. Con este tipo de filtrado se puede recolectar gran cantidad de biomasa, es decir, son útiles para grandes caudales de trabajo, aunque su tiempo de operación es relativamente elevado.

- **Centrifugación:** es una operación de separación que permite separar sólidos de líquidos de diferente densidad gracias a la acción la fuerza centrífuga producida por un movimiento rotatorio, la cual somete a la mezcla con una fuerza mayor que la de la gravedad, provocando la sedimentación de los sólidos.

Este método es muy usado para la separación de las microalgas de su medio de cultivo, eliminando así una gran parte de agua. Uno de los principales inconvenientes es su mantenimiento y su consumo energético, pero tiene una gran ventaja en cuanto a eficiencia de cosechado. El resultado de la centrifugación de microalgas es una pasta húmeda.

En algunas ocasiones, antes de estos procesos de filtración o centrifugación, es necesario la realización de un proceso de acondicionamiento debido a la muy baja concentración en la que se encuentra la biomasa, de esta manera se concentrará en una proporción bastante baja (aproximadamente de un 5%), pero que hará que el rendimiento mejore en las operaciones posteriores y haciendo que disminuya el gasto energético. Estos procesos, también de separación, son principalmente:

- a) **La coagulación y la floculación:** el proceso de coagulación-floculación, es un proceso químico, mediante el cual, gracias a la adición de sustancias denominadas coagulantes y floculantes, las microalgas forman agregados o colonias y, de esta forma, son más fáciles de recoger por cualquier otro método de separación menos costoso.
- b) **Flotación:** es un método de separación muy simple mediante el cual se hace flotar a las algas en la superficie, facilitando de este modo su cosechado. Para este proceso, es necesaria la presencia de burbujas de aire que atrapen a las microalgas y las arrastren hasta la superficie.
- c) **Sedimentación:** es una de las operaciones de separación más sencilla entre un sólido y un líquido, consistente en la acumulación de la biomasa en el fondo del biorreactor debido a su propio peso, ya que no existe la presencia de ningún mecanismo de agitación que mantenga a las microalgas en agitación. Las ventajas de la sedimentación son su bajo consumo energético, fácil diseño y el bajo requerimiento para el operario que lleve a cabo el proceso; en cambio, presenta el inconveniente de que es un proceso que sucede a una velocidad muy baja.

Selección

Para el proceso que nos concierne, al no tener un gran volumen de cultivo, no será utilizada ninguna operación de acondicionamiento (coagulación, flotación y sedimentación). De esta manera, ahorraremos tiempo y costes, ya que el hecho de no hacerlo, no va a suponer ningún inconveniente para los posteriores procesos de obtención de biomasa.

Dentro de las operaciones de separación propuestas, se ha considerado la centrifugación como mejor opción, al intentar imitar en el diseño del presente proceso, lo realizado a escala de laboratorio, en el que se ha obtenido muy buenos resultados empleando el citado método de separación. Además, obtendremos directamente la biomasa húmeda, para trabajar posteriormente con ella.

Centrífugas

En este proyecto, la centrífuga se usará para poder eliminar el máximo posible de medio de cultivo y obtener la biomasa lo más concentrada posible, por tanto, el objetivo de esta etapa es separar el agua de la biomasa para poder tratarla en el siguiente paso con un proceso de secado, y así obtener la biomasa seca.

Como se ha explicado, la centrifugación es una operación básica de separación de los sólidos contenidos en un fluido a causa de la acción de una fuerza centrífuga. Con esta operación se consigue una separación mucho más rápida y eficaz que la obtenida por simple separación gravitacional (fuerza empleada para la separación mediante la decantación o sedimentación), ya que la fuerza centrífuga puede llegar a ser del orden de 10^3 veces el valor de la fuerza de gravedad.

Las centrífugas pueden dividirse en dos grupos principalmente:

- Centrífugas de filtrado: en ellas, la fase sólida es retenida por un medio filtrante a través del cual el líquido va pasando, impulsado por el movimiento rotatorio originado por la centrífuga.
- Centrífugas de sedimentación: para su correcto funcionamiento, es necesario una diferencia de densidad entre las dos fases que ha de separar, ya sean líquido-líquido y sólido-líquido.

Selección

Para este proyecto, por las características del fluido a centrifugar, la centrífuga que se empleará es del segundo tipo, centrífugas de sedimentación, al igual que la empleada a escala de laboratorio.

A la hora de la selección de la centrífuga, el primer criterio por el que hemos de regirnos es que sea apta para aplicaciones biotecnológicas, ya que no todas las centrífugas están adaptadas para ello. Una vez restringido el grupo de centrífugas a emplear, se consideraron varias opciones comerciales disponibles en el mercado.

Tras la comparación, se ha observado que las centrífugas de sedimentación con discos dan muy buenos resultados para la separación de biomasa microalgal y son empleadas en diversas industrias y con distintos fines, todos ellos íntimamente relacionados con la biotecnología.

En las centrífugas de discos, la alimentación se introduce en el recipiente de la centrífuga giratoria desde la parte superior a través de un tubo de entrada estacionario (1), y se acelera en un distribuidor (2) antes de ingresar a la pila de discos (3), sucediendo entre los discos la separación de la fase líquida y la fase de sólidos.

La fase líquida se desplaza hacia el centro del recipiente desde donde se bombea bajo presión por medio de un disco de corte integrado (4); mientras que la fase de sólidos más pesados se recolecta en la periferia del tazón, desde donde se descarga intermitentemente a través del ciclón centrífugo. La descarga de sólidos se logra mediante un sistema hidráulico debajo del espacio de separación en el tazón, que a intervalos preestablecidos obliga a que el fondo del tazón deslizante (5) caiga hacia abajo, abriendo los puertos de los sólidos (6) en la periferia del tazón. La alta velocidad de los sólidos expulsados se reduce en el ciclón.

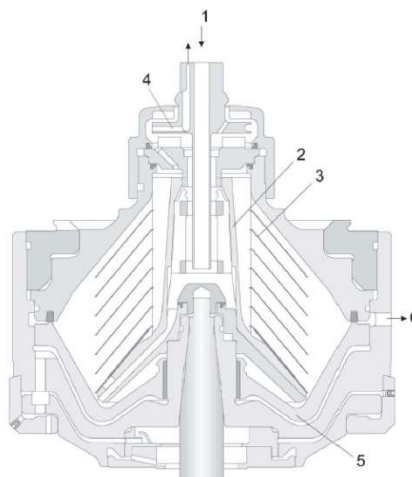


Figura A12- Esquema de una centrífuga de discos

Considerando todo esto, el modelo comercial empleado será la centrífuga BTPX 305 de la compañía Alfa Laval. Dicha centrífuga es considerada por la empresa como un equipo especializado para el trabajo a escala de planta piloto, siendo una etapa clave en la relación de los procesos a escala de laboratorio con los procesos a escala industrial.

Esta centrífuga está perfectamente adaptada para las aplicaciones biológicas gracias a un sistema de esterilización por vapor que posee.



Figura A13- Centrífuga BTPX 305

Además, es especialmente adecuada para caudales de alimentación cuyo contenido en sólidos se encuentre entre un 0,1 y un 10% del volumen total, estando nuestra concentración de microalgas comprendida en este rango. A continuación, se muestran las características de la centrífuga seleccionada.

| Datos técnicos | |
|--|--------------------|
| Capacidad hidráulica | 3m ³ /h |
| Fuerza-G, max | 12,8 |
| Velocidad bde giro | 6000-9650 RPM |
| Potencia motor instalado, control torque | 7,5 kW |
| Poder principal suplementario | 3x400x50 Hz |
| Nivel de ruido | 77 dB(A) |

Tabla A75- Datos técnicos de la centrífuga BTPX 305

| Datos físicos (aproximado) | Centrífuga | Sistema completo |
|----------------------------|------------------|-------------------|
| Peso neto | 450 kg | 1400 kg |
| Peso bruto | 600 kh | 1760 mm |
| Volumen | 1 m ³ | 12 m ³ |

Tabla A76- Datos físicos (aproximado) de la centrífuga BTPX 305

| Dimensiones principales (aproximado) | Centrífuga | Sistema completo |
|--------------------------------------|------------|------------------|
| Altura | 1200 mm | 2150 mm |
| Anchura | 900 mm | 2800 mm |
| Profundidad | 900 mm | 1300 mm |

Tabla A77- Dimensiones principales (aproximado) de la centrífuga BTPX 305

| Utilidades de consumo | |
|--|-------------------------|
| Energía eléctrica, max | 7,6 kW |
| Agua utilizada | 0,2-0,35 L por descarga |
| Descarga por encima /debajo de la pila de discos | hasta 10 L por descarga |

Tabla A78- Utilidades de consumo de la centrífuga BTPX 305

Anexo XV- Obtención de biomasa seca

Como se ha explicado en el *Anexo XIII*, la centrífuga nos proporciona una biomasa húmeda, siendo nuestro producto de interés final la biomasa seca, la cual será empleada como componente del protector solar. Esta operación recibe el nombre de secado, ya que consiste en la eliminación del agua de la pasta muy concentrada obtenida tras la centrifugación. A escala industrial, hay varios métodos ampliamente empleados para el secado de la biomasa microalgal. Los más comunes son:

- El secador solar: en este caso, la fuente calorífica causante del secado es la radiación solar, ya que las microalgas absorberán directamente esta radiación, generando vapor que deberá ser retirado por acción de una corriente de aire. Para este método de secado, hay dos factores claves que determinan la eficacia del método, como son la temperatura ambiente y la humedad relativa. Además, tienen el inconveniente de que necesitan una gran superficie, teniendo la ventaja de que es un sistema muy económico.
- Secador de tambor (Drum Drying): este equipo consiste básicamente en un tambor de metal cuyas paredes son calentadas a altas temperaturas, lo que favorece la evaporación del agua. Simultáneamente, una cuchilla va rascando lentamente la biomasa secada, dirigiéndola hacia la salida.
- Secador de ventana refractiva: es otro modelo de secador que consta de una cinta, normalmente de poliéster que se encuentra sobre la superficie de una cisterna por la que circula agua caliente. Dicho calor aportado por el agua, es transferido a la cinta que, a su vez, la transfiere a la biomasa húmeda, produciéndose la evaporación del agua y quedando, como resultado, la biomasa seca en forma de polvo.
- Spray drying: este proceso consiste en la pulverización del fluido dentro de una cámara sometida a una corriente controlada de caliente. El fluido sufre una atomización en millones de microgotas gracias a la acción de un disco rotativo o una boquilla de pulverización. La atomización hace que la superficie de contacto entre el fluido y el aire caliente aumente de manera exponencial, favoreciendo su contacto y, con ello, una rápida vaporización del agua que forma parte de la microgota. Esto hace que la biomasa pase de ser un fluido pulverizado a una especie de polvo muy fino.

- Liofilización o criodeshidratación: es un proceso de deshidratación que consiste en la eliminación del agua de un sólido por sublimación de la misma. Para conseguirlo se debe trabajar por debajo del punto triple del agua (273.16 K y 6,105kPa). Para ello, el agua debe ser previamente congelada, para que, una vez introducida en el liofilizador, pase a estado de vapor, sin encontrarse en ningún momento en estado líquido. Para acelerar el proceso se utilizan ciclos de congelación-sublimación con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto a su entrada, pero preservando la estructura molecular de la sustancia liofilizada.

Selección

El primer criterio a la hora de decidir qué método de secado es más adecuado para el presente proyecto es el hecho del gran interés en el secado de la biomasa. Los métodos con los que se obtiene mejores resultados son tanto el spray-drying como la liofilización, siendo, además, los más costosos.

Los otros métodos de secado son más económicos, especialmente el de secado solar, pero con el principal inconveniente de que ocupa una gran superficie y su eficiencia va a depender de las condiciones ambientales.

Atendiendo a lo previamente expuesto, los dos equipos que más se acercan a lo deseado, son el spray-dryer y el liofilizador, siendo la opción seleccionada para el presente proyecto la del liofilizador. El principal motivo reside en que este equipo permite la deshidratación de la muestra sin grandes cambios de temperatura, que hacen que la muestra pueda perder sus propiedades, siendo la temperatura un factor clave en la desnaturalización de proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos intracelulares. De esta manera, tendremos la certeza de que los componentes intracelulares de la microalga no se verán alterados; teniendo el inconveniente de que es un proceso que conlleva un mayor tiempo, pero al no ser un factor limitante para este caso, no resulta ningún problema.

Además, otro aspecto clave y, siempre a tener en cuenta a nivel industrial y de producción, es el hecho de que los liofilizadores son más económicos que los spray-dryers, siendo este un motivo de apoyo en la decisión tomada.

El modelo elegido para el desarrollo del proyecto es el Lyolab 0.3, de la compañía CoolVacuum Technologies.



Figura A14- Liofilizador Lyolab 3.0

Dicho modelo tiene las siguientes características:

| Datos técnicos | |
|--|--|
| Nº de bandejas | 3+1 |
| Dimensiones de bandejas (mm) | 270x395 |
| Material cámara de vacío y puerta | Acero inoxidable AISI 316L y acrílico transparente |
| Área útil total (m ²) | 0,3 |
| Inter distancia mínima | 70 |
| Rango de temp. En bandejas(°C) | de 60 a +80 |
| Capacidad del condensador | 6 |
| Temp. final del condensador (°C) | -85 |
| Caudal de la bomba de vacío (m ³ /h) | 12 |
| Potencia de calefacción (W) | 800kW |
| Compresores | 2 en cascada |
| PLC con pantalla táctil | Schneider |
| Filtro de venteo | 0,2 µm |
| Peso (Kg) | 700 |
| Dimensiones (AltoxAchoxFondo) en mm sin cierre de viales | 150x800x1000 |
| Potencia eléctrica instalada(kW) | 16 |

Tabla A79- Datos técnicos liofilizador Lyolab 3.0

Anexo XVI- Tanque de almacenamiento

Un tanque de almacenamiento no es más que un depósito donde es acumulado cualquier líquido con el fin de preservarlo y acumularlo durante un periodo de tiempo.

El diseño de planta piloto planteado tan solo requerirá de dos tanques de almacenamiento ya que todos los procesos están completamente secuenciados con la idea de ahorrar tiempo, espacio para depósitos y, con ello, dinero. Este almacenamiento podría haber sido realizado con un solo tanque de unas dimensiones mayores; pero se ha decidido emplear dos tanques por motivos de logística. Con uno de los dos tanques se alimentará a las dos primeras filas de reactores, y con el otro, a las otras dos.

Los tanques de almacenamiento estarán llenos inicialmente de agua destilada, a la cual se le añadirá el volumen necesario de las 4 soluciones que constituyen el medio de cultivo. La manera más eficiente de agitación para conseguir la homogeneización es empleando agitación neumática.

Los tanques de almacenamiento empleados han sido seleccionados del catálogo de la empresa TAPIDOL S.L. Cada tanque de almacenamiento tendrá un volumen máximo de almacenamiento de 2150 L.



Figura A15- Modelo del tanque de almacenamiento

Anexo XVII- Sistema de esterilización

Es muy importante que el medio de cultivo esté esterilizado para evitar posibles contaminaciones de nuestros reactores. Se denomina esterilización al proceso por el cual se obtiene un producto libre de microorganismos viables. El proceso de esterilización debe ser diseñado, validado y llevado a cabo para asegurar que es capaz de eliminar la carga microbiana del producto o un microorganismo más resistente.

En determinados casos, no se realiza una esterilización, sino una desinfección, que consiste en la destrucción selectiva de determinados microorganismos; mientras que la esterilización mata a todos los microorganismos.

Para la esterilización pueden emplearse agentes químicos o físicos:

- a) Los agentes químicos empleados son tóxicos para los microorganismos, causando su muerte. Algunos compuestos químicos usados para la esterilización son el cloro y el cloro.
- b) Los agentes físicos utilizados son las membranas, la radiación UV y las elevadas temperaturas.

Selección

Los métodos químicos tienen el inconveniente de que permanecen en el medio, de ahí que sean mucho más empleados para casos de desinfección que de esterilización, que es lo que realmente nos interesa. Por este motivo quedan descartados.

Dentro de los métodos físicos, la esterilización por membranas es muy cara y costosa, ya que se necesita un tamaño de poro muy pequeño que sea capaz de retener a los microorganismos. Por otro lado, la esterilización por temperatura es muy complicada de llevar a cabo a escala de planta piloto o industrial, ya que, para ello, suele emplearse un autoclave, pudiéndose esterilizar un volumen de agua muy pequeño cada vez.

Por todo esto, el método de esterilización empleado en el diseño de la planta piloto será mediante la aplicación de dosis elevadas de radiación UV, ya que es un método rápido y efectivo y se evita alterar la composición del medio de cultivo y generar residuos.

Dicho procedimiento se llevará a cabo en los dos tanques de almacenamiento de medio de cultivo. Para ello, incorporarán una recirculación en la que el fluido pase a través de un esterilizador. La salida se producirá por la parte inferior del tanque de almacenamiento y la entrada por la parte superior. La lámpara de UV utilizada para la esterilización del medio es el modelo Polaris Scientific UVA 12-C de la compañía Polaris. Dicho modelo presenta las siguientes características:

| GPM | Rated Life (hours) | Lamp Watts | Voltage @ 50/60HZ | Visual Warning | Audible Warning | Number of Lamps | Port Size Inlet/Outlet | Water Chamber | Length | Width | Maximum Pressure | Working Temp. | Wavelength | Microjoules |
|-----|--------------------|------------|-------------------|----------------|--------------------|-----------------|------------------------|---------------|--------|-------|------------------|---------------|------------|-----------------------|
| 12 | 9,000 | 39W | 110V/220V | LED | INDICATOR W/ ALARM | 1 | 3/4" MNPT | STAINLESS 304 | 36.81" | 2.5" | 125 PSI | 35°F-104°F | 254 nm | 30 mJ/cm ² |

Tabla A80- Características del tanque de almacenamiento



Figura A16- Modelo de equipo de esterilización por radiación UV

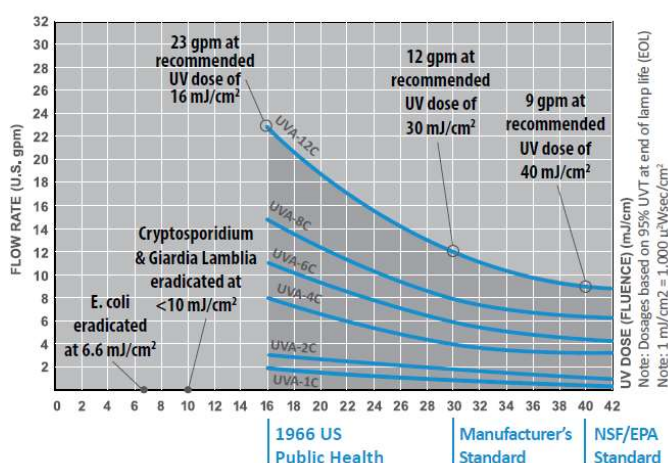


Figura A17- Dosis aplicadas por el equipo esterilizador

Anexo XVIII- Aireación

Tanto los biorreactores como los 2 tanques de almacenamiento serán agitados mediante aireación. Además, esta corriente es la que aportará el oxígeno y CO₂ a las cianobacterias, ya que estas realizan una fotosíntesis aerobia, por lo que van a necesitar el oxígeno del aire. Para ello, es necesario un equipo que pueda proporcionar un caudal de aire lo suficientemente grande como para abastecer a todos los equipos.

Se distinguen los siguientes equipos destinados a la impulsión de gases:

- Ventiladores: son equipos capaces de impulsar un gran volumen de aire, pero a una presión muy baja; de hecho, se puede tratar al fluido como incompresible por ser la presión que aportan tan baja. Se distinguen los ventiladores axiales y centrífugos en función de la dirección en la que propulsan el aire.
- Soplantes: proporcionan al fluido una presión ligeramente superior que los ventiladores a costa de propulsar un menor caudal. Pueden ser de desplazamiento positivo, centrífugos y axiales.
- Compresores: son los equipos que impulsan el aire a una presión más elevada, aunque el caudal es menor que en los otros casos.

Selección

Tanto a escala industrial como a escala de planta piloto, es necesario que los gases sean propulsados a una elevada presión para que estos circulen por el interior de los conductos, debido a que son fluidos compresibles. La presión que ejercen los ventiladores, por ejemplo, es tan baja que su función principal, y podría decirse que única, es hacer que circulen los gases, sin que varíe la densidad de estos. Por este motivo, se ha optado por un compresor como mejor opción.

Los compresores son equipos que generan un nivel de ruido altísimo, llegando incluso a los 100 decibelios. Por ello, se ha estudiado la posibilidad de adquirir un compresor de los catalogados como silenciosos. Estos compresores producen un ruido de 62 dB, que de acuerdo a la compañía Iac Acoustics es el producido aproximadamente por dos personas hablando en voz alta, lo cual es un nivel de ruido asumible.

El modelo seleccionado pertenece a la compañía CEVIK PRO y es el CA-PROSILENT

24. Los datos técnicos de este equipo son:

| | |
|----------------------------|-----------|
| <i>Tensión</i> | 230 V |
| <i>Potencia</i> | 1,5 HP |
| <i>Volumen</i> | 24 litros |
| <i>Presión</i> | 8 bar |
| <i>Caudal</i> | 150 L/min |
| <i>Frecuencia de giro</i> | 1400 RPM |
| <i>Intensidad de ruido</i> | 62 dB |

Tabla A81- Datos técnicos del compresor CA-PROSILENT 24



Figura A18- Compresor CA-PROSILENT 24

Es importante tener en cuenta que es necesaria la presencia de microfiltros en línea que esterilicen el aire impulsado por el compresor. Esto se debe a que en el aire hay muchos microorganismos y otros compuestos volátiles en suspensión, por lo que, si no hubiera filtro, todos estos contaminantes llegarían hasta el medio de cultivo.

Por coincidencia, un compresor de aire produce un relativo ambiente de humedad, calor y aceite que favorece el desarrollo de muchos organismos. Como es imposible saber en todo momento qué organismos se encuentran en un sistema de aire comprimido, es de primordial importancia implementar procesos adecuados que protejan el cultivo para, así evitar la contaminación.

Existen diversas organizaciones que establecen estándares, recomendaciones y prácticas recomendadas para mitigar el riesgo de que los productos se descompongan a causa de la contaminación con microorganismos.

Los contaminantes que se encuentran presentes de forma natural en el aire ambiente se acumulan en el compresor, creando grandes concentraciones de partículas y bacterias muy difíciles de filtrar. Además de esto, la acción mecánica del compresor introduce aún más partículas y aerosoles de aceite que se deben eliminar del aire. Cuando el aire se enfría en el tanque receptor, generalmente se vuelve 100 % saturado con vapor de agua que forma condensación. Esta condensación se arrastra aguas abajo en pequeñas gotas aerosolizadas que dañan los secadores refrigerados y si no se eliminan con un separador de arrastre y un prefiltro coalescente.

Después de salir el aire de los prefiltros, el aire ha sido tratado para eliminar los aerosoles de aire/aceite y las partículas de un tamaño de superior a 5 micras micrones. Sin embargo, el aire sigue estando saturado y cualquier enfriamiento provocará condensación. Con el tiempo, el condensado causará costosos problemas, como corrosión y congelamiento.

Es más fácil y seguro detener el crecimiento de los microorganismos que provocar su muerte cuando se encuentran en grandes concentraciones. Las dos maneras más comunes de reducir la concentración de vapor de agua y aceite es con un secador refrigerado o adsorbiendo el vapor con un secador de adsorción.

Ahora que el aire está relativamente limpio y no contiene agua o aceite aerosolizados ni partículas de gran tamaño, está listo para la filtración final antes de que el aire entre en contacto con el producto o con una superficie que entre en contacto con el producto. La filtración en el punto de uso es importante porque la filtración anterior no está diseñada para eliminar las bacterias con una tasa de retención absoluta. Finalmente, se encuentra el filtro de aire estéril, los cuales pueden diseñados específicamente para eliminar más del 99,99998 % de los contaminantes de un tamaño equivalente al de las bacterias.

Anexo XIX- Tuberías y accesorios

Los fluidos deben ser transportados de un equipo a otro por sistemas de tuberías. Dichos sistemas están compuestos por las tuberías, propiamente dichas, los accesorios, bridas y válvulas.

En el presente proyecto se necesitarán tuberías en los siguientes casos:

- Recirculación del medio de cultivo en el tanque de almacenamiento para que pase a través del equipo de esterilización.
- Transporte del medio de cultivo desde el tanque de almacenamiento hasta los fotobiorreactores situados en el exterior de la nave.
- Transporte del cosechado de los fotobiorreactores donde produce el crecimiento de la biomasa hasta los reactores donde se produce el estresado celular, situados en el interior de la nave.
- Recirculación durante el estresado de la biomasa para que ésta pase a través del equipo con la lámpara UV.
- Transporte de la biomasa tras su estresado hasta la centrífuga.
- Transporte del oxígeno y del CO₂, desde el compresor y la botella de CO₂, respectivamente, hasta todos los fotobiorreactores.

Selección del material

El material de las tuberías debe ser seleccionado en función de las características del fluido a transportar. En nuestro caso, los fluidos a transportar son:

- Gases (aire y CO₂)
- Medio de cultivo
- Cultivo (con biomasa)

Ninguno de los dos líquidos (el medio de cultivo y el cultivo en sí pueden ser considerados como agua) tiene unas características que hagan que se descarte un material u otro, debido a que no son corrosivos ni tienen propiedades restrictivas. Por este motivo, para la selección nos ceñiremos al aspecto económico. Se realizarán los cálculos asumiendo que el agua se encuentra a 25°C. Sus propiedades a esta temperatura son:

| | |
|--------------------------|--------------------------|
| <i>Densidad</i> | 997,13 kg/m ³ |
| <i>Viscosidad</i> | 0,000891 kg/(m·s) |

Tabla A82- Propiedades del agua a 25°C

Para los fluidos se ha decidido emplear tuberías de plástico, concretamente de PVC, ya que presenta atractivas características que lo hacen ser un muy buen candidato:

- 1) Es económico y de alta disponibilidad.
- 2) Presenta una baja pérdida de carga puesto que presenta muy poca rugosidad relativa.
- 3) Es un material ligero y de fácil instalación.
- 4) Tiene una buena resistencia química (este requisito no nos afecta).

En el caso de los gases, el material empleado es acero al carbono debido a que presenta una mayor resistencia a la presión.

Pérdida de carga en tuberías para líquidos

Se ha seleccionado PVC como el material para los conductos por los que circulan líquidos. Dichos conductos han sido seleccionados del catálogo de la empresa Adequa. Se ha optado por un conducto con DN de 40 mm, que es mismo que el de las salidas del tanque de almacenamiento.

Tubos de evacuación estructurada UNE-EN 1453-1 con junta pegada
Tubagens de esgoto estruturadas UNE-EN 1453-1 com junta de colar

| DN (mm) | Espesor (mm) | Longitud (m) | Nº Tubos/Palé | Código | €/Ud |
|---------|--------------|--------------|---------------|---------|-------|
| 32 | 3,0 | 5 | 250 | 1004650 | 8,82 |
| 40 | 3,0 | 5 | 180 | 1100785 | 10,94 |
| 50 | 3,0 | 5 | 150 | 1100767 | 13,07 |
| 75 | 3,0 | 5 | 68 | 1100788 | 22,64 |
| 90 | 3,0 | 5 | 69 | 1100791 | 26,25 |
| 110 | 3,2 | 5 | 76 | 1100793 | 33,81 |
| 125 | 3,2 | 5 | 53 | 1100795 | 38,56 |
| 160 | 3,2 | 5 | 28 | 1100797 | 50,19 |
| 200 | 3,9 | 5 | 18 | 1100799 | 78,95 |
| 63 | 3,0 | 4 | 116 | 2133928 | 13,54 |

Figura A19- Diámetro de tubería seleccionado

La citada empresa, debajo de la tabla que se presenta incluye la siguiente anotación:

* Los accesorios que tienen identificación  disponen de certificación de producto AENOR según UNE-EN 1329-1 y de reacción al fuego (Euroclase B-s1,d0 según UNE-EN 13501-1).

* Los accesorios señalados con  presentan resistencia pasiva al fuego, con Euroclase B-s1,d0 según norma UNE-EN 13501-1.

Figura A20- Normativa por la que se rigen las tuberías seleccionadas

Una vez conocido el diámetro, se ha calculado la pérdida de carga por fricción en la tubería para los diferentes tramos. Dicha pérdida de carga se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$h_f = f * \frac{L}{D} * \frac{v^2}{2 * g} \quad (15)$$

Donde:

- h_f : pérdida de carga por fricción.
- f : coeficiente de pérdida de carga.
- L : longitud de la tubería (m).
- D : diámetro de la tubería (m).
- v : velocidad del fluido (m/s).
- g : aceleración de la gravedad ($9,81 \text{ m/s}^2$).

La velocidad del fluido se calcula de acuerdo a la siguiente expresión:

$$v = \frac{Q}{S} \quad (16)$$

Donde:

- v : velocidad del fluido (m/s).
- Q : caudal volumétrico (m^3/h).
- S : sección de paso.

El coeficiente de pérdida de carga, f , se calcula utilizando una gráfica denominada Diagrama de Moody. Para ello, es necesario conocer el Número de Reynold, Re , y la rugosidad relativa. Los tubos de PVC son considerados como tubos lisos. El número de Reynold se define de la siguiente manera:

$$Re = \frac{\rho * v * D}{\mu} \quad (17)$$

Donde:

- Re : número de Reynold.
- ρ : densidad del fluido (kg/m^3).
- v : velocidad del fluido (m/s).
- μ : viscosidad dinámica ($\text{kg}/(\text{m}\cdot\text{s})$)
- D : diámetro del conducto

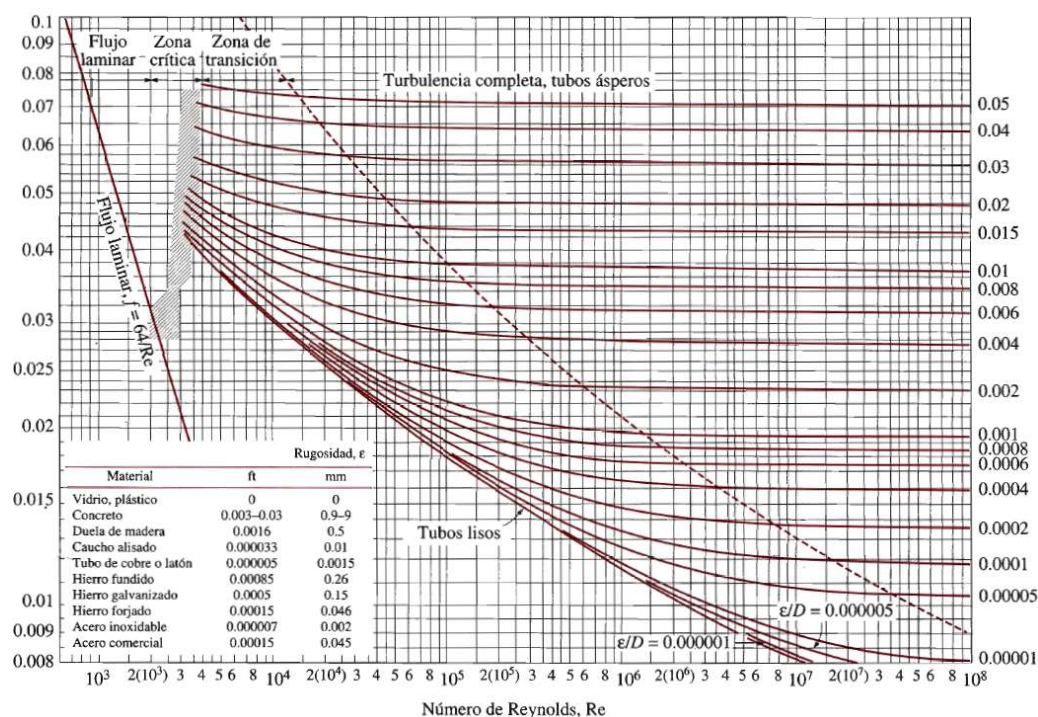


Figura A21- Diagrama de Moody

Pérdida de carga en tuberías para gases

Los gases también experimentan una pérdida de carga o, lo que es lo mismo, una caída de presión, en su circulación por el interior de los conductos. En este caso, la caída de presión entre dos puntos se calcula aplicando la fórmula de Renouard:

$$P_1^2 - P_2^2 = 51,5 * \rho * L * \frac{Q^{1,82}}{D^{4,82}} \quad (18)$$

Donde:

- P_1 y P_2 : presión a la entrada y a la salida de la tubería (bar).
- ρ : densidad del gas (kg/m^3).
- L : longitud de la tubería.
- Q : caudal volumétrico (kg/m^3).
- D : diámetro de la tubería.

Pérdida de carga en accesorios

El fluido a su paso por los accesorios, también experimenta una pérdida de carga, la cual se determina de acuerdo a la siguiente expresión:

$$h_{f,acc} = K \frac{v^2}{2 * g} \quad (19)$$

Donde:

- $H_{f,acc}$: pérdida de carga en el accesorio (m).
- K : coeficiente de pérdida de cargas en el accesorio.
- v : velocidad del fluido a su paso por el accesorio (m/s).
- g : aceleración de la gravedad ($9,81 \text{ m/s}^2$).

Los valores del coeficiente de pérdida de carga vienen recogidos en la siguiente tabla:

| Pieza, conexión o dispositivo | K_i |
|-------------------------------|-------|
| Rejilla de entrada | 0.80 |
| Válvula de pie | 3.00 |
| Entrada cuadrada | 0.50 |
| Entrada abocinada | 0.10 |
| Entrada de borda o reentrada | 1.00 |
| Ampliación gradual | 0.30 |
| Ampliación brusca | 0.20 |
| Reducción gradual | 0.25 |
| Reducción brusca | 0.35 |
| Codo corto de 90° | 0.90 |
| Codo corto de 45° | 0.40 |
| Codo largo de 90° | 0.40 |
| Codo largo de 45° | 0.20 |
| Codo largo de $22^\circ 30'$ | 0.10 |
| Tee con flujo en línea recta | 0.10 |
| Tee con flujo en ángulo | 1.50 |
| Tee con salida bilateral | 1.80 |
| Válvula de compuerta abierta | 5.00 |
| Válvula de ángulo abierta | 5.00 |
| Válvula de globo abierta | 10.0 |
| Válvula alfallera | 2.00 |
| Válvula de retención | 2.50 |
| Boquillas | 2.75 |
| Controlador de gasto | 2.50 |
| Medidor Venturi | 2.50 |
| Confluencia | 0.40 |
| Bifurcación | 0.10 |
| Pequeña derivación | 0.03 |
| Válvula de mariposa abierta | 0.24 |

Tabla A83- Valores del coeficiente de pérdida de carga

Los accesorios necesarios son:

- a) Válvulas de globo.
- b) Válvulas de compuerta.
- c) Codos cortos de 90°
- d) Reducciones y ensanchamiento debido a que la bomba centrífuga tiene un diámetro de succión y se aspiración de una pulgada, mientras que las tuberías tienen un diámetro de 40 mm.

Anexo XX- Bombas

La presencia de bombas es necesaria para la circulación de cualquier líquido, siempre que este no pueda fluir por acción de la gravedad. Con esto, podemos definir las bombas hidráulicas como aquellos equipos mecánicos encargados de la propulsión de los fluidos que circulan por el interior de conductos o tuberías, cuando que la fuerza de la gravedad no puede originar su movimiento.

De esta manera, las bombas constituyen un equipo fundamental en cualquier instalación con fluidos, ya que suministra a estos la energía necesaria para llegar a los puntos deseados. Para la selección de la bomba empleada, siempre se han de tener en cuenta los siguientes parámetros o criterios básicos:

- a) Naturaleza del fluido a bombear: tales como su viscosidad, densidad... y si puede ser corrosivo.
- b) Condiciones de operación: es un criterio determinante para la selección de la bomba el caudal que es necesario bombear y la temperatura y presión a la que se encuentra.
- c) Criterios económicos, al igual que para todos los equipos.

Las bombas se pueden clasificar en dos grandes grupos de acuerdo al sistema de propulsión del fluido que tengan:

- De desplazamiento positivo: estas bombas permiten un trabajo con grandes caudales con el inconveniente de que fracciona el caudal. Su funcionamiento está basado en el movimiento repetitivo de una pieza que le confiere energía al fluido. Estas bombas proporcionan una cantidad de líquido constante en cada embolada o revolución de la parte móvil, sin que el líquido pueda circular libremente a través del cuerpo de la bomba. A su vez, este tipo de bombas, según el mecanismo de impulsión del líquido se divide en dos subgrupos:
 - Bombas alternativas: que constan de un émbolo o diafragma que con su movimiento alternativo proporcionan energía al fluido.
 - Bombas rotatorias: en estas bombas, el desplazamiento del líquido se produce por la rotación de una o más piezas en el interior de una carcasa, determinando unas cavidades en las que se aloja el líquido que se desplaza desde la entrada de la bomba hasta la zona de descarga. Algunos ejemplos

son las de ruedas dentadas de lóbulos y las de paletas. Una clase de bombas dentro de este grupo son las bombas peristálticas, las cuales constan de una tubería flexible que puede ser comprimida por unas ruedas que giran continuamente provocando la circulación del fluido en la dirección del giro. Presentan la ventaja de que no existe posibilidad de fuga del fluido, aunque el inconveniente de que el material plástico de la conducción debe ser cambiado con el paso del tiempo, debido al desgaste mecánico que sufre al estar en contacto con la rueda.

- Bombas centrífugas: este tipo de bombas tienen la ventaja de que sí proporcionan un caudal continuo en todo momento, aunque tienen muy limitado su caudal de trabajo. A pesar de ello, son muy utilizadas debido a su versatilidad y fácil mantenimiento. El fluido adquiere energía gracias a la fuerza centrífuga que la bomba le hace experimentar.

Selección

La naturaleza del fluido a emplear siempre ha de ser el punto de partida para la elección del tipo de bombas. En este caso, el fluido es bien el medio de cultivo o bien el cultivo con biomasa microalgal.

El medio de cultivo, el cual puede ser considerado como agua, puede ser impulsado por cualquier tipo de bombas. Se ha optado por el uso de bombas centrífugas para la impulsión del medio de cultivo fresco, debido a que son capaces de impulsar grandes caudales sin producir su fraccionamiento.

En cambio, cuando se impulsa el medio de cultivo con la biomasa es muy importante que esta no sufra daño alguno, lo cual puede originar su lisis celular por cizalladura cuando pasa a través de la bomba. El movimiento acelerado que le proporciona la bomba centrífuga puede ser letal para la biomasa, por lo que este tipo de bombas no es adecuado cuando se ha de impulsar un cultivo con microorganismos vivos.

Por tanto, la opción elegida para el transporte del cultivo, es una bomba de desplazamiento positivo. Dentro de este grupo, las más utilizadas en los casos en los que se ha de impulsar un cultivo son las bombas peristálticas (incluida en el grupo de bombas rotatorias), ya que el paso por la bomba no supone ningún estrés ni daño al microorganismo, por lo que este será el tipo de bomba empleado para impulsar el cultivo.

Se ha de emplear el uso de bombas en los siguientes casos:

- Recirculación del cultivo en el tanque de almacenamiento para su esterilización por radiación UV.
- Impulsión del medio de cultivo desde tanque de almacenamiento hasta los fotobiorreactores destinados al crecimiento de la biomasa.
- Transporte de la biomasa desde los fotobiorreactores para el crecimiento hasta los fotobiorreactores en los que se produce el estresado celular.
- Para el estresado. La biomasa se ha de recircular pasando a través del equipo que contiene la lámpara UV y volviendo de nuevo al fotobiorreactor.
- Transporte de la biomasa, una vez estresada, desde los fotobiorreactores hasta la centrífuga.

Junto a los tanques de almacenamiento ha de haber una bomba la cual impulse el cultivo desde el tanque hasta los fotobiorreactores y además sea la responsable de la recirculación del cultivo haciendo que pase por el equipo esterilizador. Por este motivo, no interesará una bomba con un caudal de trabajo muy pequeño, ya que eso implicaría mucho tiempo y el refrescado de los 10 biofotorreactores no se puede realizar simultáneamente, puesto que el operario deberá ir dirigiendo, mediante el movimiento de válvulas, el biorreactor que se ha de refrescar en cada instante. El modelo empleado es el NIZA 4.4 de la compañía Bombas HASA. Las características de dicho modelo son:

| Modelo Model Modèle | P2 | | I (A) | | | Ø | | Altura manométrica / Height / Hauteur (m) | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|------|------|------------|------------|------------|-----|-----|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|--|--|
| | kW | CV | 1~ 230V | 3~ 230V | 3~ 400V | Asp | Imp | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 | 70 | 80 | | |
| NIZA 4.2 M (NIZA 35/2M) | 0,26 | 0,35 | 2,4 | - | - | 1" | 1" | 4000 | 3300 | 1200 | | | | | | | | | | | | | |
| NIZA 4.3 M (NIZA 50/3M) | 0,37 | 0,5 | 3,3 | - | - | 1" | 1" | 4800 | 4200 | 2400 | 2000 | 1800 | | | | | | | | | | | |
| NIZA 4.4 M (NIZA 80/4M) | 0,55 | 0,75 | 3,9 | - | - | 1" | 1" | 4800 | 4200 | 4000 | 3500 | 2800 | 2100 | 300 | | | | | | | | | |
| NIZA 4.5 M | 0,75 | 1 | 5,6 | - | - | 1" | 1" | 5000 | 4500 | 4200 | 3800 | 3300 | 2800 | 2200 | 1800 | 1500 | 1200 | 1000 | 800 | 600 | 500 | | |
| NIZA 4.5 T | 0,75 | 1 | - | 3,3 | 1,9 | 1" | 1" | 5000 | 4500 | 4200 | 3800 | 3300 | 2800 | 2200 | 1800 | 1500 | 1200 | 1000 | 800 | 600 | 500 | | |

Figura A22- Modelo de bomba centrífuga seleccionada

Como se ha explicado, el sistema para el estresado está constituido por un fotobiorreactor de 40 L, el cual tendrá una salida por su parte inferior que, conectada a una bomba mediante una tubería, impulsará el fluido a través del equipo con la lámpara UV para su posterior vuelta al reactor. Por este motivo, cada fotobiorreactor asociado a un sistema de estresado precisará de una bomba. Se ha calculado que el caudal de trabajo para el estresado debe ser igual a 100 L/h. El modelo de bomba seleccionado para dicha operación es el I12, de la compañía Peribest Pumps. Dicho modelo presenta las siguientes características:

| ESPECIFICACIONES TÉCNICAS | MODELO I12 |
|---------------------------|--|
| Caudal Máximo (continuo) | 205 l/h |
| Capacidad | 0,043 l/rev |
| Presión Máx. Descarga | 10 bar |
| Temperatura Máxima | 80 °C |
| Diámetro Interior | 13 mm. |
| Material Manguera | NR, EPDM, NBR (Alimentario) y Hypalon® |
| Material Conexiones | AISI-316, PP, PVDF (PTFE) |

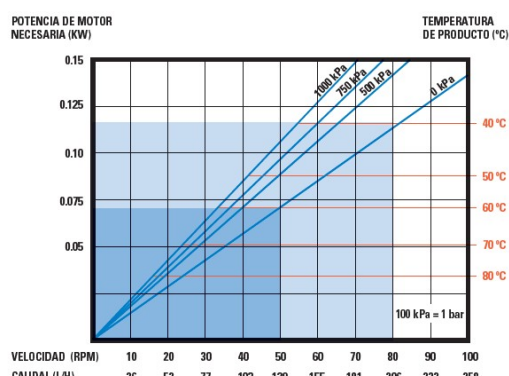


Figura A23- Características de la bomba peristáltica del modelo I12 de la compañía Peribest

Además, con la intención de optimizar los recursos, se ha diseñado la planta de forma que la salida de cada uno de estos 10 equipos esté conectada en serie con las demás salidas y, la bomba más cercana a la centrífuga estará, también, conectada con esta. De esta manera, esta bomba impulsará todo el cultivo tras el estresado hasta la centrífuga. Se ha buscado, únicamente para este caso, un modelo capaz de impulsar un caudal superior para optimizar los tiempos. El modelo I17 de la misma compañía, cuyas características son:

| ESPECIFICACIONES TÉCNICAS | MODELO I17 |
|---------------------------|--|
| Caudal Máximo (continuo) | 500 l/h |
| Capacidad | 0,109 l/rev |
| Presión Máx. Descarga | 10 bar |
| Temperatura Máxima | 80 °C |
| Diámetro Interior | 16 mm. |
| Material Manguera | NR, EPDM, NBR (Alimentario) y Hypalon® |
| Material Conexiones | AISI-316, PP, PVDF (PTFE) |

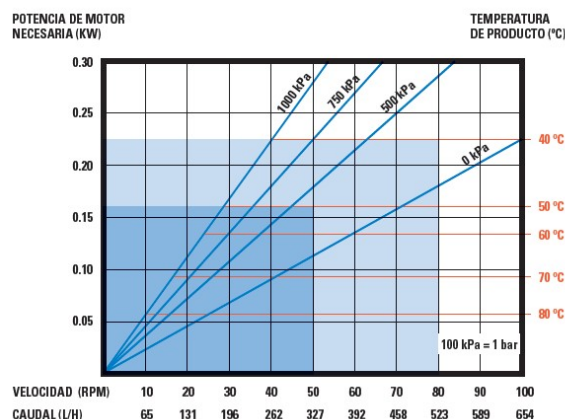


Figura A24- Características de la bomba peristáltica del modelo I17 de la compañía Peribest

Cálculo de la potencia

La potencia consumida por una bomba se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$P = \frac{Q_v * \rho * g * h_A}{\eta} \quad (20)$$

Siendo:

- P: potencia consumida por la bomba (W).
- Q_v : caudal volumétrico impulsado por la bomba (m^3/s).
- ρ : densidad del fluido (se considerará la densidad del agua a 25°C : 997 kg/m^3).
- g: aceleración de la gravedad ($9,81 \text{ m/s}^2$).
- h_A : carga de la bomba (m)
- η : rendimiento de la bomba. Se considerará un rendimiento del 85%.

Todos estos valores son conocidos a excepción de la carga de la bomba. Dicho valor se determina a partir de la ecuación de Bernouilli generalizada.

$$\frac{P_2 - P_1}{\rho * g} + (z_2 - z_1) + \frac{v_2^2 - v_1^2}{2 * g} + h_f = h_A \quad (21)$$

Los puntos 1 y 2 se sitúan en:

- Punto 1: salida (siempre en la parte inferior) del equipo desde el que se impulsa el fluido:
- Punto 2: entrada (siempre en la parte inferior) del equipo hasta el que se impulsa el fluido.

En dicha ecuación, las letras representan:

- P: presión (Pa).
- ρ : densidad del fluido a transportar (kg/m^3).
- g: aceleración de la gravedad ($9,81 \text{ m/s}^2$).
- z: altura (m)
- v: velocidad del fluido (m/s).
- h_f : pérdida de carga en tuberías y accesorios (m).
- h_A : carga de la bomba

Anexo XXI- Relación de RedField

La relación de RedField establece las proporciones de los tres principales componentes de los medios de cultivo: carbono, nitrógeno y fósforo. Dicha relación es:

$$C : N : P \rightarrow 106 : 16 : 1$$

Se ha calculado la cantidad total de N y P el medio de cultivo utilizado anualmente. Con dicho dato, se podrá calcular los moles totales de nitrógeno y fósforo aportado de la siguiente manera:

$$12132 \text{ g de } KNO_3 \cdot \frac{1 \text{ mol de } KNO_3}{101,1032 \text{ g de } KNO_3} \cdot \frac{1 \text{ mol de } N}{1 \text{ mol de } KNO_3} = 119,9962 \text{ moles de } N$$

$$850 \text{ g de } Na_2HPO_4 \cdot \frac{1 \text{ mol de } Na_2HPO_4}{141,96 \text{ g de } Na_2HPO_4} \cdot \frac{1 \text{ mol de } P}{1 \text{ mol de } Na_2HPO_4} = 5,9876 \text{ moles de } P$$

En este medio de cultivo, la relación entre nitrógeno y fósforo es de 24. A continuación, se puede calcular los moles de carbono que serán necesarios aportar en forma de CO_2 a lo largo de un año.

$$119,9962 \text{ moles de } N \cdot \frac{106 \text{ moles de } C}{16 \text{ moles de } N} = 794,98 \text{ moles de } C$$

A continuación, se puede calcular el carbono aportado por el CO_2 que se encuentra en el aire.

$$\frac{96L}{1h} \cdot \frac{24h}{1 \text{ día}} \cdot \frac{365 \text{ días}}{1 \text{ año}} \cdot \frac{1m^3}{10^3L} = 840,960 \frac{m^3}{\text{año}}$$

$$P \cdot V = n \cdot R \cdot T \rightarrow n = \frac{p \cdot V}{R \cdot T} = \frac{101325 \cdot 840,960}{8,314 \cdot 298} = 34392,65216 \text{ moles de aire}$$

Sabiendo que el aire contiene un 0,035% de CO_2 , podemos calcular los moles de CO_2 total aportados:

$$\text{moles de } CO_2 = 34392,65216 \cdot 0,00035 = 12,04 \text{ moles de } CO_2 = 12,04 \text{ moles de } C$$

Este carbono no es suficiente para que se cumpla la relación de RedField, por lo que será necesario un aporte extra mediante botellas de CO₂. Las botellas seleccionadas tienen una carga de 38 kg de CO₂, lo que equivale a:

$$50 \text{ Kg } CO_2 \cdot \frac{10^3 \text{ g } CO_2}{1 \text{ Kg } CO_2} \cdot \frac{1 \text{ mol } CO_2}{44,01 \text{ g } CO_2} = 1136,105431 \text{ moles de } CO_2$$

La cantidad de CO₂ contenida en esa botella sí sería suficiente para cumplir la relación de RedField, pero es necesario un aporte extra, ya que no todo podrá ser asimilado y escapará en la corriente gaseosa.

Anexo XXII- Arcón congelador

Se ha seleccionado este arcón modelo Combatep S-40 del grupo SELECTA debido a las características citadas por la empresa: “Mueble exterior recubierto en epoxi. Recinto interior en aluminio gofrado con guía soporte para el apoyo de cestas o bandejas. Encimera y contrapuerta moldeada en ABS resistente y de fácil limpieza. Puerta abatible con bisagras compensadas y cerradura con llave. Grupo compresor hermético, silencioso y sin vibraciones.” Además, posee un panel de mandos con: “Regulador de la temperatura. Display digital de la temperatura real y prefijada. Pulsador selector de la temperatura”.

| MODELOS | Código | Capacidad litros | Capacidad de congelación en 24 h Kg | Temperatura hasta °C | Alto/Ancho/Fondo (interior) cm | | | Alto/Ancho/Fondo (exterior) cm | | | Consumo W | Peso Kg |
|----------------|---------|---------------------|---|-------------------------|-----------------------------------|-----|----|-----------------------------------|-----|----|--------------|------------|
| COMBATEMP S-30 | 2101040 | 206 | 28 | -28 | 74 | 63 | 53 | 92 | 75 | 71 | 160 | 38 |
| COMBATEMP I-30 | 2101041 | 343 | 38 | -28 | 74 | 100 | 53 | 92 | 113 | 71 | 200 | 56 |
| COMBATEMP S-40 | 2101181 | 215 | 30 | -45 | 63 | 89 | 41 | 92 | 113 | 76 | 230 | 57 |
| COMBATEMP L-40 | 2101182 | 352 | 40 | -45 | 65 | 117 | 58 | 92 | 127 | 81 | 280 | 72 |

Figura A25- Modelo de arcón congelador seleccionado

Anexo XXIII- Paneles LED

Para la correcta iluminación de la planta se ha optado por un Panel de 72W de Datasheet. El panel cuenta con diodo de alta luminosidad, que proporciona una luz uniforme en todo el panel, lo que unido a su metacrilato óptico de alta reflexión aprovecha al máximo la luminosidad emitida por el conjunto de diodos LED que con su sistema de un arranque inmediato y sin parpadeos, permite proyectar una luz de manera uniforme y sin deslumbramiento.

| | |
|--|---------------|
| <i>Potencia nominal</i> | 72W |
| <i>Tensión nominal</i> | 85V-265V |
| <i>CRI (Índice Reproducción Cromática)</i> | 80 |
| <i>Clase Energética: A+</i> | A+ |
| <i>Luminosidad</i> | 6120 |
| <i>Tipo de LEDs</i> | SMD 4014 |
| <i>Angulo de Apertura</i> | 120° |
| <i>Eficacia Diodo LED</i> | 130Lm/W |
| <i>Eficacia luminosa</i> | 85 Lm/W |
| <i>Medidas</i> | 1195x595x12mm |
| <i>Rango Temperatura</i> | -20°C ;+55°C |
| <i>Material de construcción</i> | Aluminio |

Tabla A84- Características de los paneles LED seleccionados

Anexo XXIV- Impacto ambiental

Normativa Vigente

A la hora del desarrollo del proceso de producción se ha de tener siempre presente la Ley de Impacto Ambiental vigente en todo momento. A fecha de julio de 2019, la ley vigente es Ley 21/2013, 9 de diciembre, de Impacto Ambiental.

Esta ley establece las bases que deben regir la evaluación ambiental de los planes, programas y proyectos que puedan tener efectos significativos sobre el medio ambiente, garantizando en todo el territorio del Estado un elevado nivel de protección ambiental, con el fin de promover un desarrollo sostenible, mediante:

- a) La integración de los aspectos medioambientales en la elaboración y en la adopción, aprobación o autorización de los planes, programas y proyectos.
- b) El análisis y la selección de las alternativas que resulten ambientalmente viables.
- c) El establecimiento de las medidas que permitan prevenir, corregir y, en su caso, compensar los efectos adversos sobre el medio ambiente.
- d) El establecimiento de las medidas de vigilancia, seguimiento y sanción necesarias para cumplir con las finalidades de esta ley.

Asimismo, esta ley establece los principios que informarán el procedimiento de evaluación ambiental de los planes, programas y proyectos que puedan tener efectos significativos sobre el medio ambiente, así como el régimen de cooperación entre la Administración General del Estado y las comunidades autónomas a través de la Conferencia Sectorial de Medio Ambiente.

Los procedimientos de evaluación ambiental se sujetarán a los siguientes principios:

- a) Protección y mejora del medio ambiente.
- b) Precaución y acción cautelar.
- c) Acción preventiva, corrección y compensación de los impactos sobre el medio ambiente.
- d) Quien contamina paga.
- e) Racionalización, simplificación y concertación de los procedimientos de evaluación ambiental.

- f) Cooperación y coordinación entre la Administración General del Estado y las Comunidades Autónomas.
- g) Proporcionalidad entre los efectos sobre el medio ambiente de los planes, programas y proyectos, y el tipo de procedimiento de evaluación al que en su caso deban someterse.
- h) Colaboración activa de los distintos órganos administrativos que intervienen en el procedimiento de evaluación, facilitando la información necesaria que se les requiera.
- i) Participación pública.
- j) Desarrollo sostenible.
- k) Integración de los aspectos ambientales en la toma de decisiones.
- l) Actuación de acuerdo al mejor conocimiento científico posible.

Esta Ley no tiene regulada los cultivos de microalgas, por lo que podría considerarse dentro del anexo de ganadería y agricultura.

Residuos producidos

En el presente proceso de producción, el único residuo que se obtiene es el agua una vez el cultivo ha sido centrifugado. Por este motivo, no hay ningún residuo peligroso cuyo vertido pueda resultar contaminante.

Además, se procurará que el agua sea reutilizada, de manera que no sería vertida al exterior; aunque en caso de serlo, no sería contaminante.

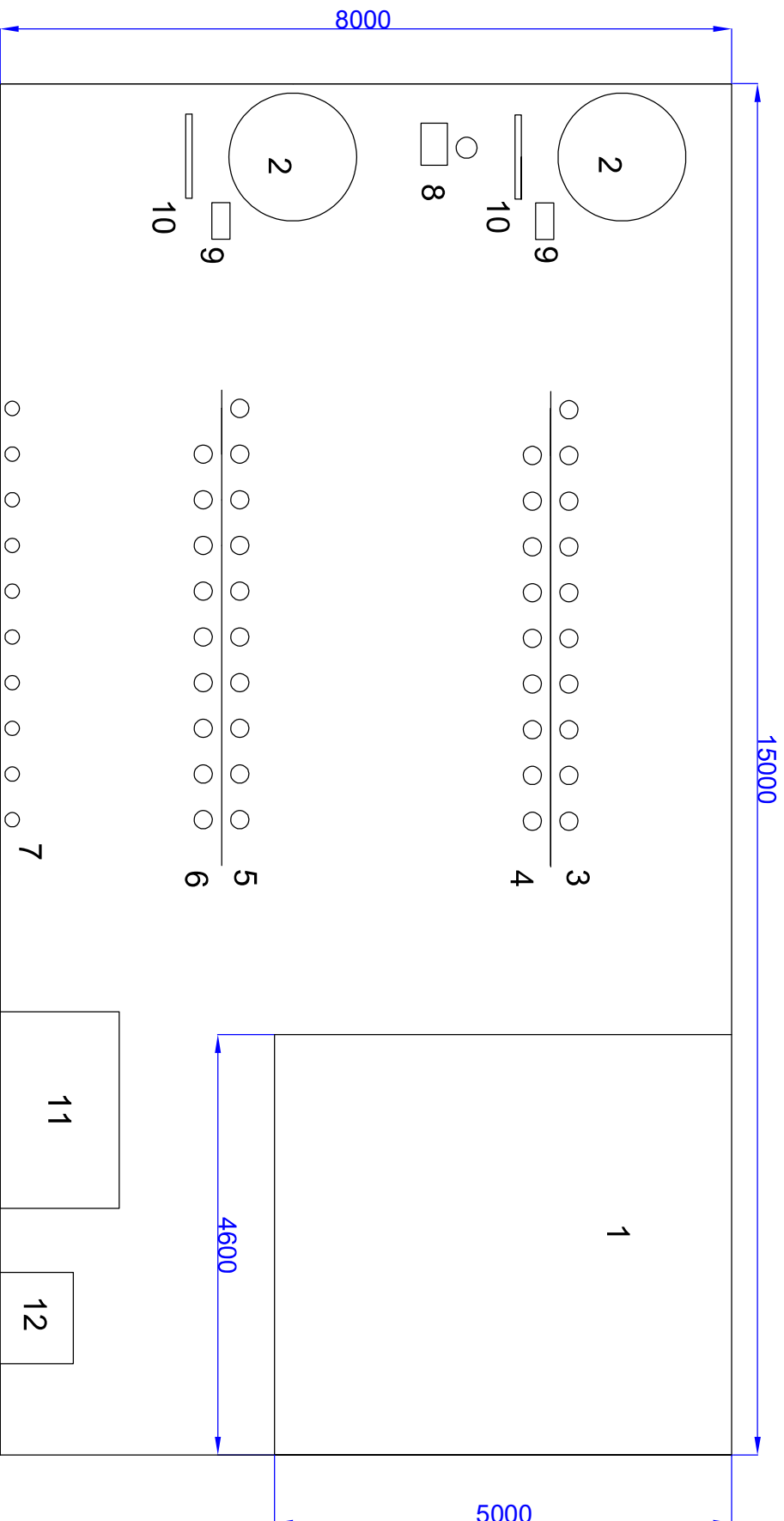
Ruidos, olores, e impacto visual

Ningún equipo de los utilizados produce intensidades sonoras superiores a los 75 dB, luego no se producirá ningún ruido molesto que pueda afectar a las edificaciones colindantes y a las personas que se sitúen en el exterior de la planta.

Además, no se producirán olores.

Para disminuir el impacto visual, se procurará que el recorrido seguido por las tuberías esté lo más oculto posible.

DOCUMENTO III: PLANOS



Leyenda:

| | |
|--------------------------------------|-------------------------------|
| 1: Laboratorio | 7: Sistemas de estresado |
| 2: Tanque de almacenamiento | 8: Compresor y botella de CO2 |
| 3: Fila 1 de fotobiorreactores (F-1) | 9: Bomba centrífuga |
| 4: Fila 2 de fotobiorreactores (F-2) | 10: Equipo de esterilización |
| 5: Fila 3 de fotobiorreactores (F-3) | 11: Centrífuga |
| 6: Fila 4 de fotobiorreactores (F-4) | 12: Liofilizador |



Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz

Título del proyecto: Diseño y validación de un método no invasivo para la determinación del factor de protección de cremas solares, fabricación de una crema a partir de microalgas y su proceso de producción

Título del plano: Distribución de los equipos en planta

Autor: Javier Outón Porras

DNI: 77175255C Firma:

Fecha: julio, 2019

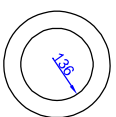
Formato: A3

Escala: 1:50

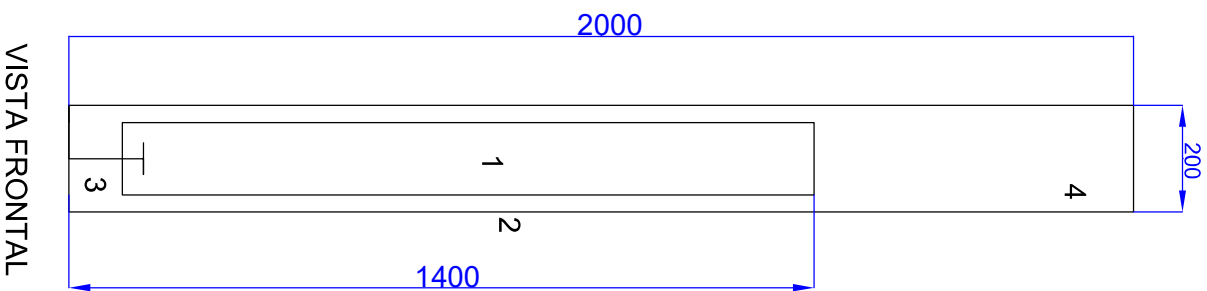
Nº Plano:

1

Nota: las unidades están en mm




VISTA SUPERIOR



VISTA FRONTAL

| Leyenda: |
|-------------------------------|
| 1: Riser |
| 2: Downcomer |
| 3: Base |
| 4: zona de desorción de gases |



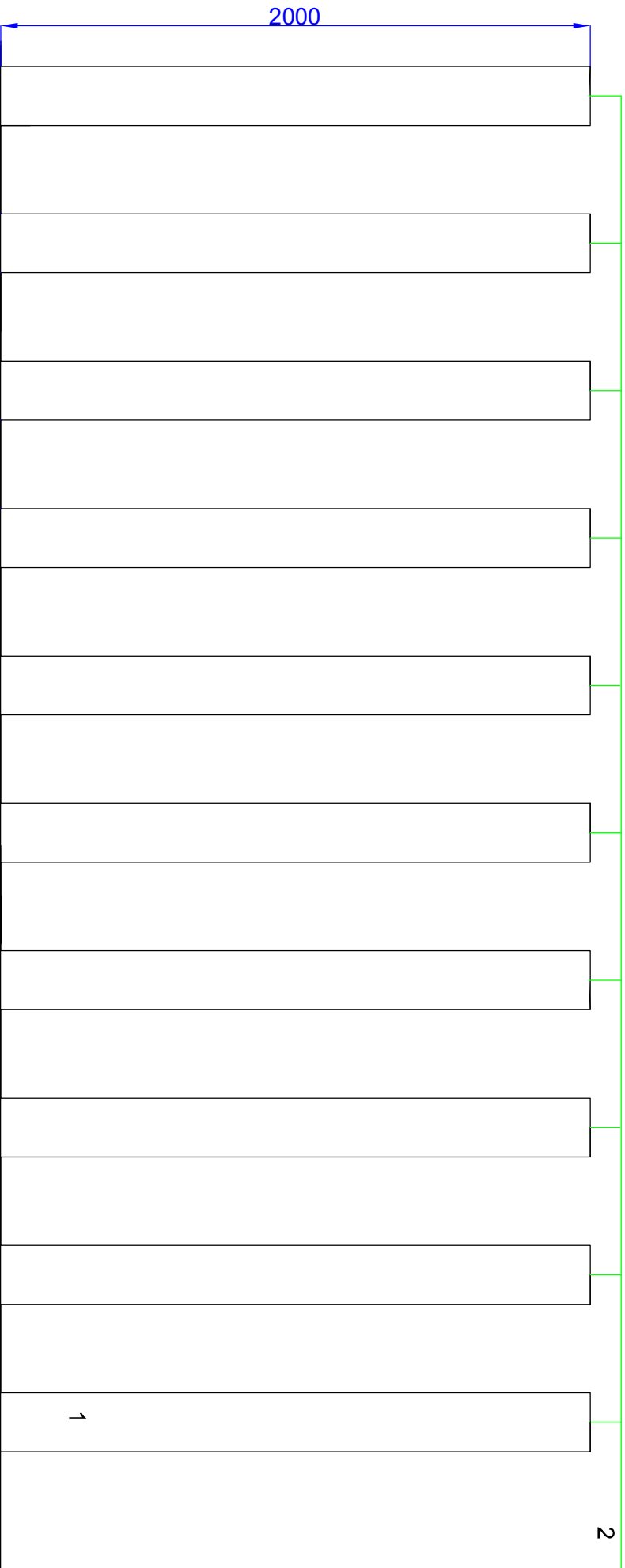
Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz

Título del proyecto: Diseño y validación de un método no invasivo para la determinación del factor de protección de cremas solares, fabricación de una crema a partir de microalgas y su proceso de producción

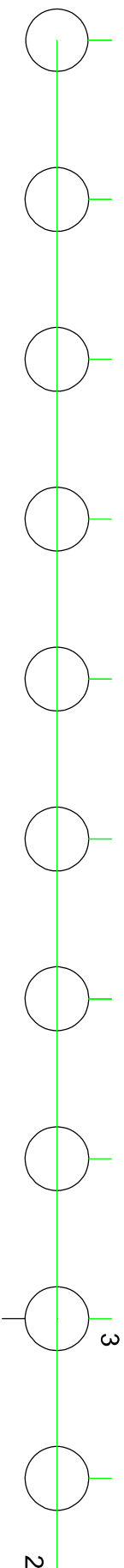
Título del plano: Planta y Alzado del reactor

| | | |
|----------------------------|--------|-----------------------|
| Autor: Javier Outón Porras | | Nº Plano: 2 |
| DNI: 77175255C | Firma: | |
| Fecha: julio, 2019 | | |
| Formato: A3 | | |
| Escala: 1:10 | | |

Nota: las unidades están en mm




VISTA FRONTAL



VISTA SUPERIOR

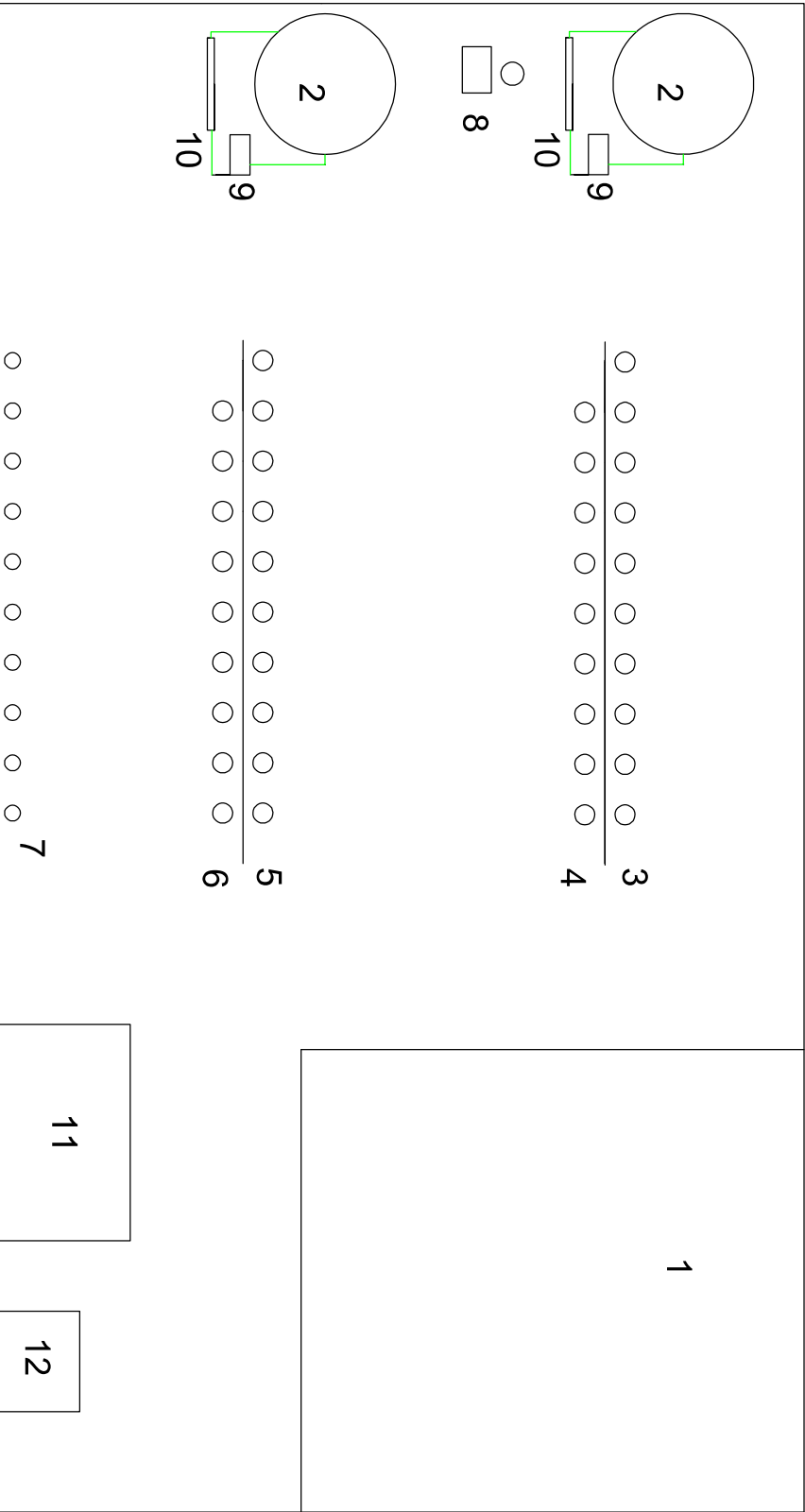
| Leyenda | |
|---------|---|
| 1- | Fotobiorreactor aiiñi |
| 2- | Alimentación de los fotobiorreactores |
| 3- | Tuberías hacia los reactores de estresado |



Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz


Título del proyecto: Diseño y validación de un método no invasivo para la determinación del factor de protección de cremas solares. Fabricación de una crema a partir de microalgas y su proceso de producción

Título del plano: Fotobiorreactores destinados al estresado de *Anabaena* sp.



Leyenda:

| | |
|--------------------------------------|-------------------------------|
| 1: Laboratorio | 7: Sistemas de estresado |
| 2: Tanque de almacenamiento | 8: Compresor y botella de CO2 |
| 3: Fila 1 de fotobiorreactores (F-1) | 9: Bomba centrífuga |
| 4: Fila 2 de fotobiorreactores (F-2) | 10: Equipo de esterilización |
| 5: Fila 3 de fotobiorreactores (F-3) | 11: Centrífuga |
| 6: Fila 4 de fotobiorreactores (F-4) | 12: Liofilizador |

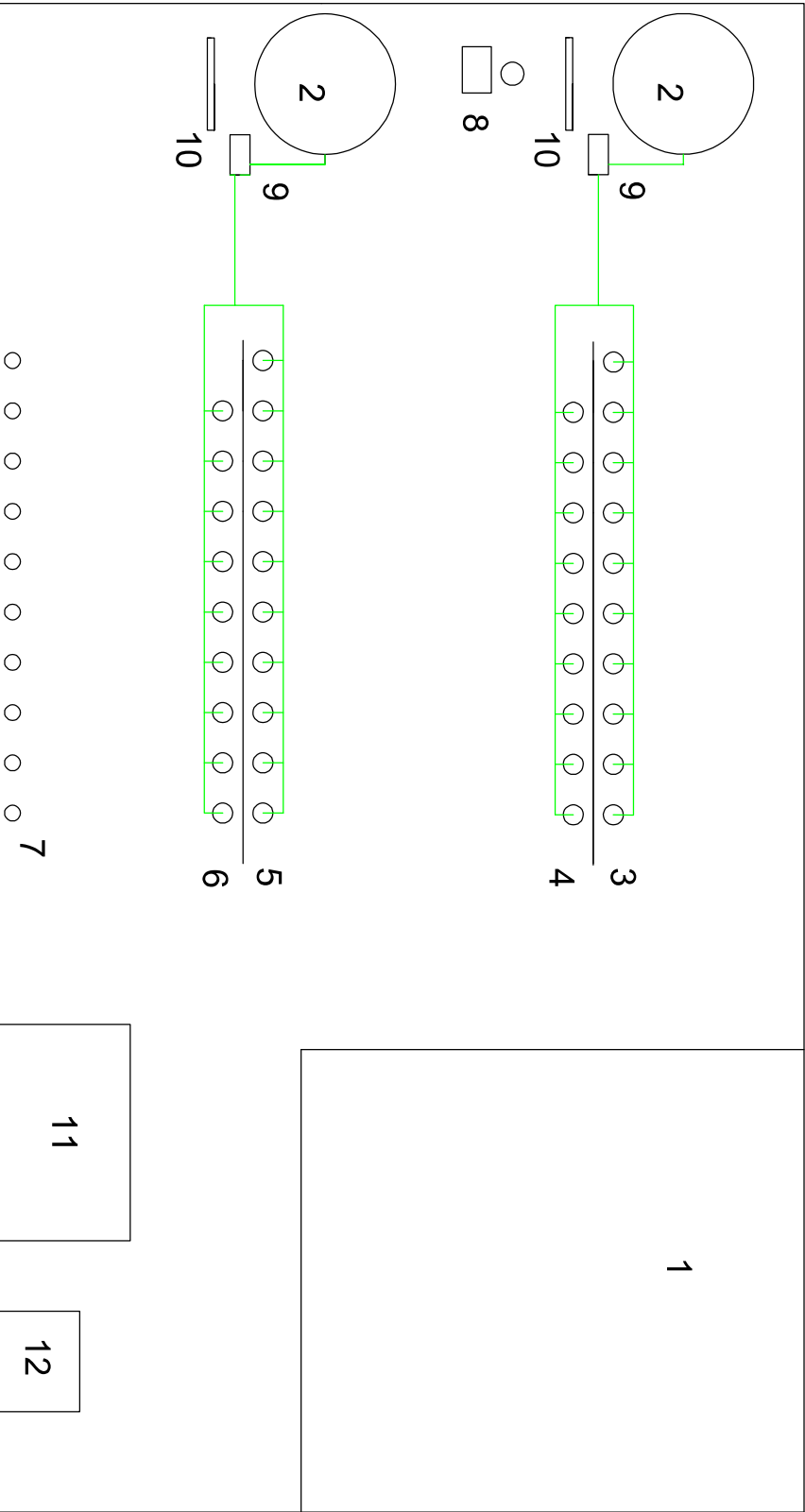


Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz

Título del proyecto: Diseño y validación de un método no invasivo para la determinación del factor de protección de cremas solares, fabricación de una crema a partir de microalgas y su proceso de producción


Título del plano: Circuito 1 de tuberías en la planta

| | | | |
|----------------------------|--|--------------------|-----------------------|
| Autor: Javier Outón Porras | | Fecha: julio, 2019 | Nº Plano: 4 |
| DNI: 77175255C Firma: | | | |
| Formato: A3 | | | |
| Escala: 1:50 | | | |



Leyenda:

| | |
|--------------------------------------|-------------------------------|
| 1: Laboratorio | 7: Sistemas de estresado |
| 2: Tanque de almacenamiento | 8: Compresor y botella de CO2 |
| 3: Fila 1 de fotobiorreactores (F-1) | 9: Bomba centrífuga |
| 4: Fila 2 de fotobiorreactores (F-2) | 10: Equipo de esterilización |
| 5: Fila 3 de fotobiorreactores (F-3) | 11: Centrífuga |
| 6: Fila 4 de fotobiorreactores (F-4) | 12: Liofilizador |



Universidad de Cádiz

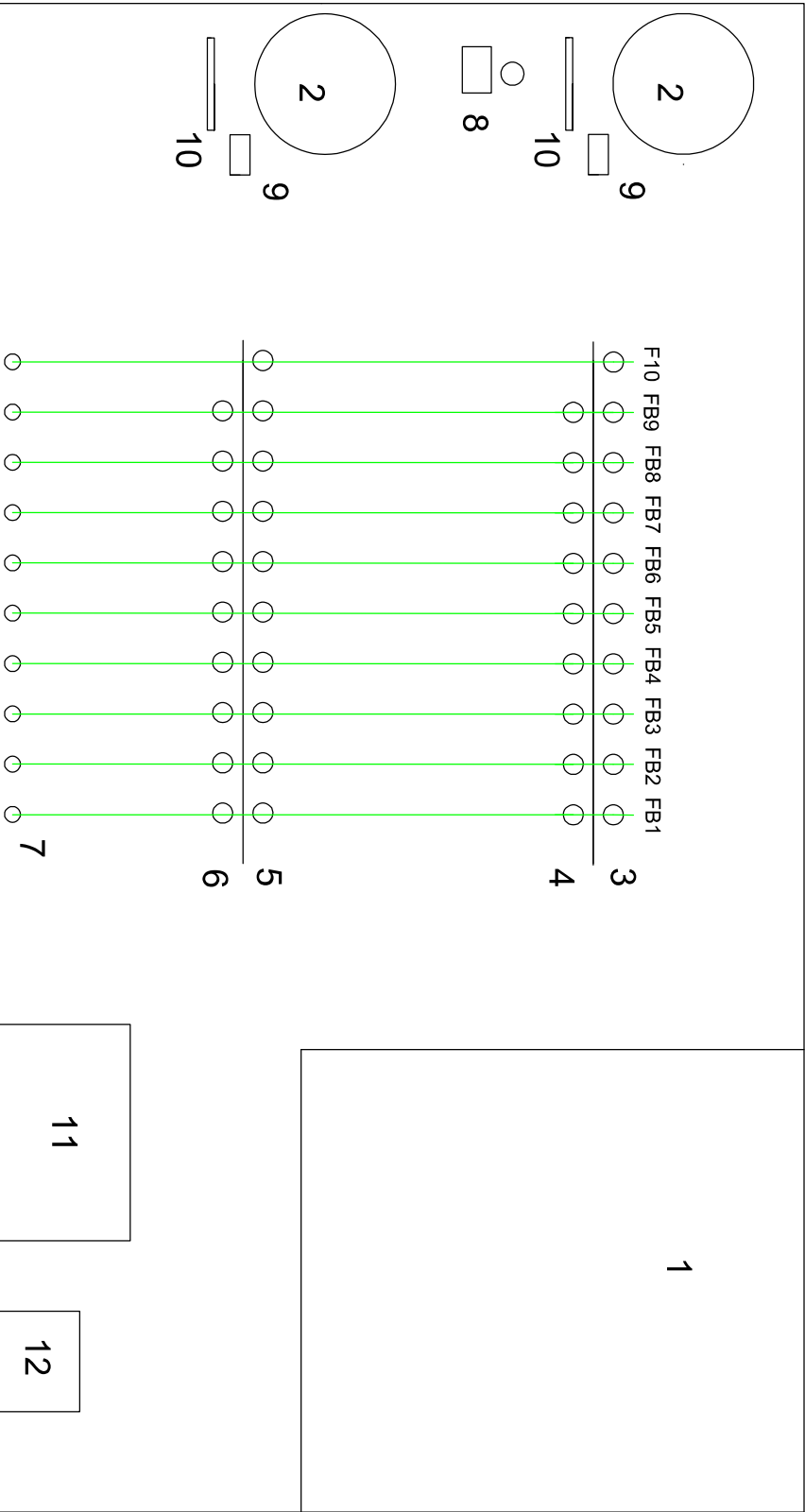
Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz

Título del proyecto: Diseño y validación de un método no invasivo para la determinación del factor de protección de cremas solares, fabricación de una crema a partir de microalgas y su proceso de producción


Título del plano: Circuito 2 de tuberías de la planta destinado a alimentar los fotobiorreactores

| | | | |
|----------------------------|--|--------------------|-------------|
| Autor: Javier Outón Porras | | Fecha: julio, 2019 | |
| DNI: 77175255C Firma: | | Formato: A3 | Nº Plano: 5 |
| | | Escala: 1:50 | |

Nota: las unidades están en mm



| | |
|--------------------------------------|--|
| Leyenda: | |
| 1: Laboratorio | |
| 2: Tanque de almacenamiento | |
| 3: Fila 1 de fotobiorreactores (F-1) | |
| 4: Fila 2 de fotobiorreactores (F-2) | |
| 5: Fila 3 de fotobiorreactores (F-3) | |
| 6: Fila 4 de fotobiorreactores (F-4) | |
| 7: Sistemas de estresado | |
| 8: Compresor y botella de CO2 | |
| 9: Bomba centrífuga | |
| 10: Equipo de esterilización | |
| 11: Centrífuga | |
| 12: Liofilizador | |



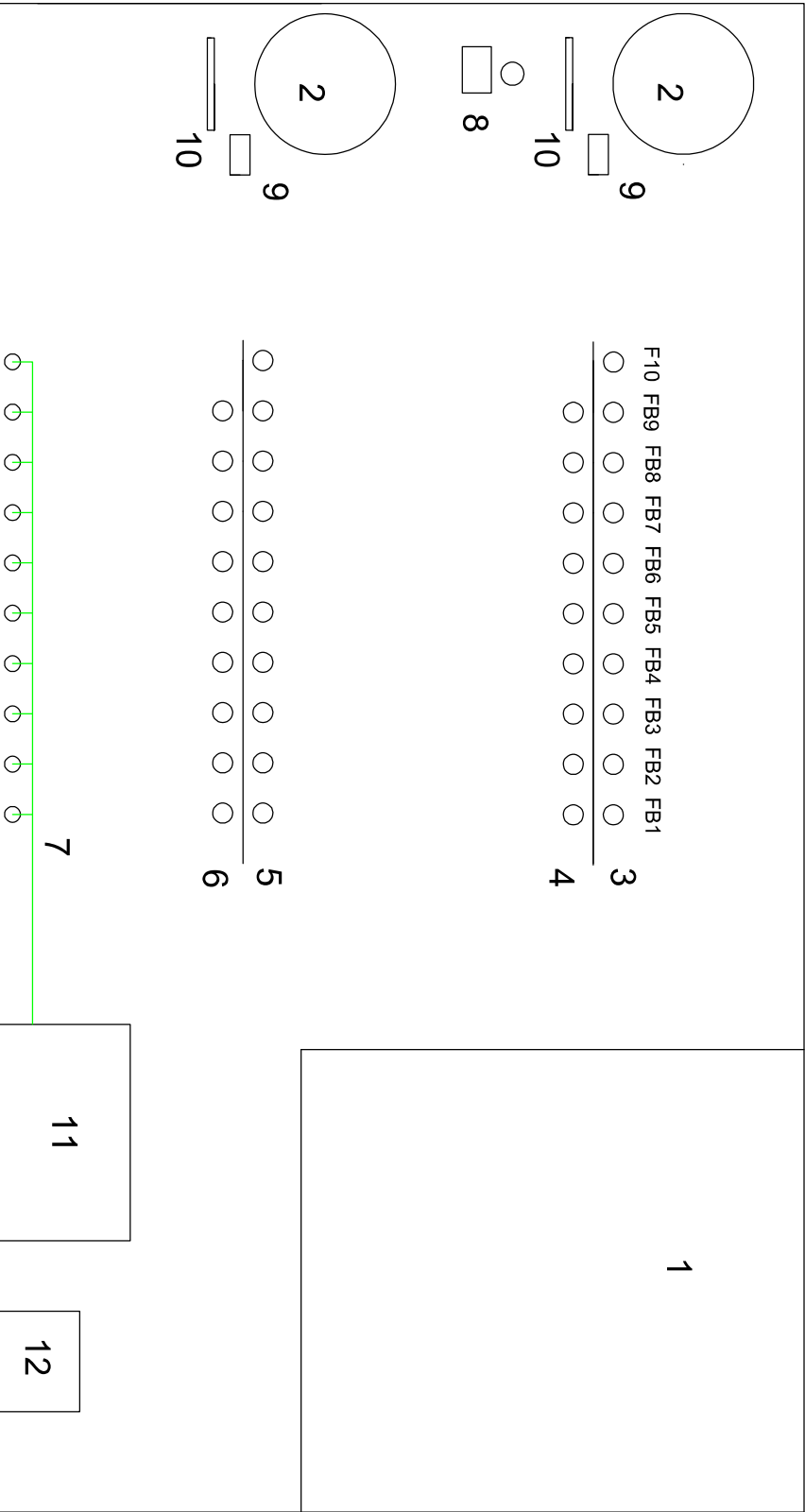
UCA
Universidad
de Cádiz

Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz

Título del proyecto: Diseño y validación de un método no invasivo para la determinación del factor de protección de cremas solares, fabricación de una crema a partir de microalgas y su proceso de producción


Título del plano: Circuito 3 de tuberías, destinado al transporte de la biomasa desde los fotobiorreactores de crecimiento hasta los de estresado

| | | | |
|----------------------------|--|--------------------|-----------------------|
| Autor: Javier Outón Porras | | Fecha: julio, 2019 | Nº Plano: 6 |
| DNI: 77175255C Firma: | | | |
| | | Formato: A3 | |
| | | Escala: 1:50 | |



Leyenda:

| | |
|--------------------------------------|-------------------------------|
| 1: Laboratorio | 7: Sistemas de estresado |
| 2: Tanque de almacenamiento | 8: Compresor y botella de CO2 |
| 3: Fila 1 de fotobiorreactores (F-1) | 9: Bomba centrífuga |
| 4: Fila 2 de fotobiorreactores (F-2) | 10: Equipo de esterilización |
| 5: Fila 3 de fotobiorreactores (F-3) | 11: Centrífuga |
| 6: Fila 4 de fotobiorreactores (F-4) | 12: Liofilizador |

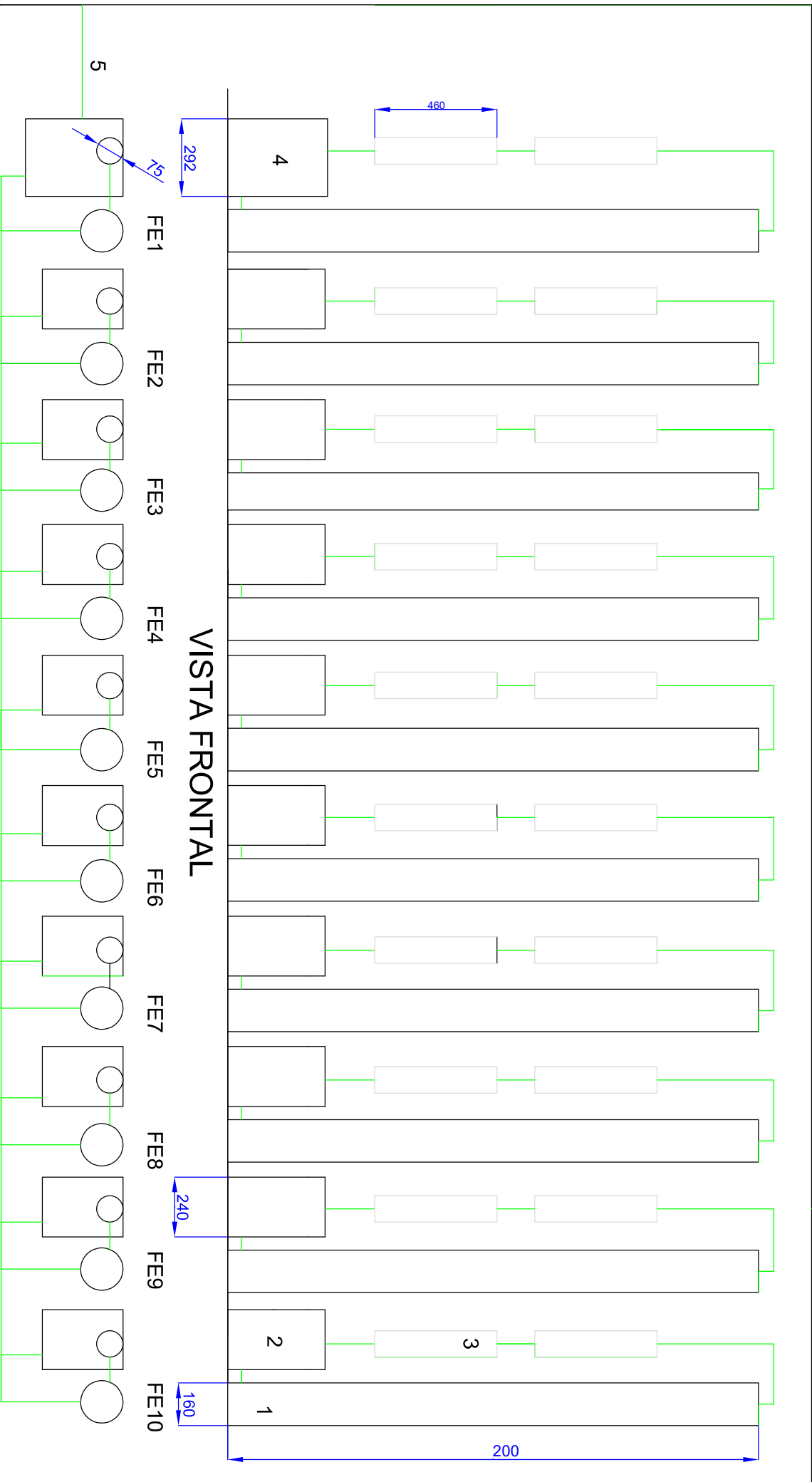


Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz

Título del proyecto: Diseño y validación de un método no invasivo para la determinación del factor de protección de cremas solares. Fabricación de una crema a partir de microalgas y su proceso de producción

Título del plano: Circuito 5 de tuberías, transporte de la biomasa cosechada hasta la centrífuga


| | | | |
|----------------------------|--|--------------------|-------------|
| Autor: Javier Outón Porras | | Fecha: julio, 2019 | |
| DNI: 77175255C Firma: | | Formato: A3 | Nº Plano: 7 |
| | | Escala: 1:50 | |



| Leyenda | |
|---------|--|
| 1- | Fotobiorreactor de estresado |
| 2- | Bomba peristáltica I12 |
| 3- | Lámpara de UVB |
| 4- | Bomba peristáltica I17 |
| 5- | Tubería que dirige a la centrifuga |
| 6- | Conexión de los biorreactores de estresado |

VISTA SUPERIOR

VISTA FRONTAL

| | | |
|---|--|--|
|  UCA Universidad de Cádiz | Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz | |
| | Título del proyecto: Diseño y validación de un método no invasivo para la determinación del factor de protección de cremas solares. Fabricación de una crema a partir de microalgas y su proceso de producción Título del plano: Fotobiorreactores destinados al estresado de <i>Anabaena</i> sp. | |

Nota: las unidades están en mm

Nota: en la vista frontal no se ha representado el modo en el que los 10 fotobiorreactores están conectados

| | | |
|----------------------------|--|--------------------|
| Autor: javier Otlón Porras | | Fecha: julio, 2019 |
| DNI: 77175255C Firma: | | Nº Plano: 8 |
| Formato: A3 | | |
| Escala: 1:35 | | |

| | |
|-------------|--------------|
| Formato: A3 | Escala: 1:35 |
| | |

DOCUMENTO IV: PLIEGO DE CONDICIONES

1. Condiciones generales

1.1 Objetivo del Pliego de Condiciones

El presente Pliego de Condiciones tiene como misión establecer las condiciones, económicas, administrativas, facultativas, técnicas y legales que se han de regir para el desarrollo del proceso de producción de biomasa microalgal con el fin de que esta pueda ser empleada para la elaboración de protectores solares, de manera que pueda materializarse en las condiciones especificadas, evitando posibles interpretaciones que difieran de las deseadas.

En el Pliego de Condiciones no deben contradecirse leyes ni normas, sino complementarlas; y no debe omitirse ni dejar nada a la interpretación personal, pues, cualquier omisión podría generar conflictos en la obra. Además, no debe incluir el articulado de las normas técnicas, sino que debe referirlas.

Este Documento adquiere su verdadera importancia durante la ejecución del Proyecto, ya que vincula las relaciones entre Propiedad y constructor, y debe aportarse, junto con los planos, al Contrato de obra. Por lo tanto, el Contratista está obligado a ejecutar el Proyecto según se especifica en el Pliego de Condiciones. Del mismo modo, la administración podrá conocer de forma detallada las diferentes tareas que se desarrollarán durante la ejecución del Proyecto.

1.2- Cuerpo normativo

El cuerpo normativo de aplicación en la ejecución de las obras objeto del presente Proyecto, será el formado por toda la Legislación de Obligado Cumplimiento que sea aplicable en la fecha de la firma del Contrato de adjudicación de las obras. Si entre la normativa de aplicación existiese contradicción, será la Dirección Facultativa quien manifieste por escrito la decisión a tomar en el Libro de Órdenes. Será responsabilidad del Contratista cualquier decisión tomada en los supuestos anteriores si esta no está firmada en el Libro de Órdenes por la Dirección Facultativa y, por tanto, estará obligado a asumir las consecuencias que deriven de las órdenes que debe tomar la Dirección Facultativa para corregir la situación creada.

El citado cuerpo normativo consta de:

- Pliego de Prescripciones Técnicas Generales vigentes del M.O.P.U
- Normas Básicas y Tecnológicas de la Edificación.
- Ley 31/1995 del 8 de noviembre, de Prevención de Riesgos Laborales.
- Real Decreto 1627/1997, del 24 de octubre, por el que se establecen disposiciones mínimas de seguridad y salud en las obras de construcción.
- Normas concernientes a la construcción de la planta y diseño de equipos:
 - Normas ASME.
 - Normas TEMA.
- Normativa concerniente a procedimientos administrativos.
- Normativa que puede afectar a los materiales, equipos y unidades de obra incluidos en el Proyecto.
 - Normas UNE.
 - Normas ISO.

1.3- Documentos del Proyecto

Los documentos del Trabajo de Fin de Grado que definen las obras y que la Propiedad entrega al Contratista pueden tener carácter contractual o meramente informativo. Se entiende por documentos contractuales aquellos que estén incorporados al Contrato y que sean de obligado cumplimiento, excepto modificaciones debidamente autorizadas.

El presente TFG consta de los siguientes documentos:

- Memoria: incluye el problema que se pretende resolver con el Proyecto en cuestión, los resultados experimentales obtenidos y la solución adoptada para ello.
- Anexos: incluyen los cálculos necesarios para el escalamiento del proceso.
- Planos: contienen todas las representaciones gráficas necesarias para la realización del Proyecto.
- Pliego de Condiciones: en el que se establecen las condiciones técnicas y legales necesarias que hay que adoptar para que se lleve a cabo la ejecución del Proyecto.
- Presupuesto: gastos que conlleva la implantación del Proyecto.

Son documentos contractuales los Planos, el Pliego de Condiciones y el Presupuesto. La Memoria y los Anexos tienen carácter meramente informativo. Lo expuesto en el presente Pliego de Condiciones prevalecerá en todos los casos sobre las contraindicaciones u omisiones que, con relación a él, pudieran existir en los documentos que conformen el Proyecto de Obra.

Las omisiones en Planos y Pliegos de Condiciones Técnicas, o las descripciones erróneas de los detalles de la obra, que sean manifiestamente indispensables para la terminación de los trabajos según la Normativa Vigente, no sólo no exime al Contratista de la obligación de ejecutarlos, sino que por el contrario deberá realizarlos como si hubieran sido completa y correctamente especificados en dichos Documentos.

2. Condiciones facultativas

2.1. Disposiciones generales

Se establecen las siguientes disposiciones generales:

- Reglamento de contratación de competencias locales.
- Ley, Reglamento y Pliego de contrataciones del Estado.
- Pliego de Cláusulas económico-administrativas particulares.
- Ley de Contrato de trabajo y disposiciones vigentes que regulan las relaciones patrón-obrero.
- Ordenanza Laboral de Seguridad e Higiene en el trabajo, así como cualquier otra que se dicte con carácter general.

2.2. Términos del Pliego de Condiciones

El significado y explicación de los principales términos que aparecen en el presente Pliego de Condiciones es el siguiente:

- Propiedad: los derechos de este Proyecto pertenecen a la empresa o autoridad pública que decida incorporar esta planta como Propiedad suya.
- Dirección de Obra: tiene la misión de representar a la Propiedad, defender sus intereses y establecer las relaciones contractuales con el Contratista adjudicatario de la obra del Proyecto. Se encarga de que la obra sea una reproducción fidedigna de lo proyectado y estipulado en este Pliego, así como con su intervención se garantiza la inspección de materiales, el estado de los equipos, el perfecto funcionamiento y el apoyo técnico al Contratista. Está constituida por el Titulado Superior y Titulado Medio que designa la Propiedad en su momento.
- Contratista: es la entidad fiscal que contrata con la Propiedad la ejecución material de toda la obra o, al menos, una parte de ella. Cuando en el Pliego se refiere al Contratista, se refiere al Contratista general de la obra y no a las subcontratas que este haya podido realizar. No podrá hacer uso de la documentación del Proyecto para cualquier otro fin diferente al desarrollo del mismo.

2.3- Dirección Facultativa

La Dirección Facultativa de las obras e instalaciones recaerá sobre el ingeniero técnico nombrado por la Propiedad en su representación, sobre quién recaerán todas las labores de Dirección, control y vigilancia de las obras del presente Proyecto.

La Dirección Técnica podrá ordenar, antes de la ejecución de las obras, las modificaciones de detalle del Proyecto que crea oportunas siempre que no alteren las líneas generales del citado Proyecto, no excedan la garantía técnica y sean razonablemente aconsejadas por eventualidades surgidas durante la ejecución de los trabajos o por mejoras que se crea conveniente introducir.

Las principales funciones del Ingeniero Director de Obra son las siguientes:

- Garantizar la ejecución de las obras con estricta sujeción al Proyecto aprobado, realizando únicamente las modificaciones debidamente autorizadas.
- Definir las condiciones técnicas que en el presente Pliego de Condiciones se dejen a su decisión.
- Resolver aquellas condiciones técnicas que surjan en cuanto a la interpretación de los planos, condiciones de materiales y de ejecución de unidades de obra, siempre que no se modifiquen las condiciones del Contrato.
- Estudiar las incidencias y problemas planteados en las obras que impidan el normal cumplimiento del Contrato o aconseje su modificación, tramitando en su caso, las propuestas correspondientes.
- Proponer las actuaciones procedentes para obtener, de los organismos oficiales y de los particulares, los permisos y autorizaciones necesarias para la ejecución de las obras y ocupaciones de los bienes afectados por ellas; y resolver los problemas planteados por los servicios relacionados con la misma.
- Asumir bajo su responsabilidad, en caso de urgencia o necesidad, la Dirección inmediata de determinadas operaciones o trabajos en curso, por lo cual, el Contratista deberá poner a su disposición y servidumbre todo lo necesario relacionados con la misma.
- Acreditar al Contratista las obras realizadas conforme a lo dispuesto en los documentos del Contrato.

2.4. El Contratista

El Contratista tiene la obligación de designar un jefe de obras como representante suyo autorizado que será quien cuide de los trabajos. Cualquier cambio que el Contratista desee realizar respecto a sus representaciones y personal cualificado, y en especial, del jefe de obras, deberá comunicárselo de manera obligatoria a la Dirección Facultativa.

El Contratista, por sí mismo o por medio de sus representantes o encargados, estará en la obra durante la jornada legal de trabajo y acompañará a la Dirección Facultativa en las visitas que haga a la obra. Así mismo, asistirá a las reuniones de obra que se convoquen, no pudiendo justificar por motivo de ausencia ninguna reclamación a las órdenes cruzadas por la Dirección Facultativa. Se considera que el Contratista ha comprobado el lugar de construcción y los planos y que ha quedado conforme con las condiciones en que habrá que ejecutarse el trabajo.

El Contratista deberá conocer todas las disposiciones laborales que pueden ser de aplicación en la realización del trabajo y cumplirlas. Además, proporcionará un número suficiente de operarios, personal supervisor y administrativo para cumplir los plazos.

Será por cuenta del Contratista los gastos que a continuación se citan:

- Los gastos de construcción y retirada de toda clase de construcciones auxiliares.
- Los gastos de alquiler o adquisición de terreno para el depósito de materiales y maquinaria.
- Los gastos de protección de acopio y de la propia obra contra deterioro, daño o incendio, cumpliendo con los requisitos vigentes para proporcionar seguridad dentro de las obras.
- Los gastos de limpieza y evacuación de desperdicios de basura.
- Los gastos de montaje, conservación y retirada de instalaciones para el suministro de agua y la energía eléctrica necesaria para las obras.
- Los gastos de demolición y desmontaje de las instalaciones provisionales.
- Los gastos de retirada de materiales rechazados y corrección de las deficiencias observadas y puestas de manifiesto por los correspondientes ensayos y pruebas.

2.5- Facultades en la Dirección de la obra

La Dirección de Obra es la única capacitada para la interpretación del Proyecto y para la proposición de órdenes complementarias que faciliten la ejecución del mismo.

La Dirección de Obra podrá ordenar, antes de la ejecución de las obras, las modificaciones del Proyecto que crea oportunas siempre que no altere las líneas generales de este, no exceda la garantía técnica y sean razonables y aconsejadas por eventualidades surgidas durante la ejecución de los trabajos o por mejoras que crea conveniente introducir.

Todas las alteraciones técnicas o presupuestarias derivadas de estas posibles modificaciones serán aceptadas por el Contratista. Por el contrario, cualquier modificación del Proyecto propuesta por el Contratista deberá ser previamente aprobada por la Dirección de Obra, que la evaluará antes de su aprobación o desaprobación, aceptando el primero la resolución adoptada.

2.6- Libro de Órdenes

Es aquél en el que se reflejarán las visitas realizadas por la Dirección de la obra, las incidencias surgidas y, en general, aquellos datos que sirvan para determinar con certeza si el Contratista ha cumplido los plazos y fases de ejecución previstas para la realización del Proyecto.

El Ingeniero Director de la obra, y los demás facultativos colaboradores en la Dirección de las mismas, irán dejando constancia, mediante las oportunas referencias, de sus visitas e inspecciones y las incidencias que surjan en el transcurso de ellas y obliguen a cualquier modificación en el Proyecto o la ejecución de las obras. Dichas referencias serán de obligado cumplimiento. Las anotaciones en el Libro de Órdenes darán fe a efectos de determinar las posibles causas de resolución e incidencias del Contrato.

2.7- Reclamaciones contra la Dirección

Las reclamaciones que el Contratista quiera hacer contra las órdenes emanadas de la Dirección Facultativa, solo podrá presentarlas a través de la misma, ante la Propiedad, si ellas son de orden económico, y de acuerdo con las condiciones estipuladas en los Pliegos de Condiciones correspondientes.

Contra las disposiciones de orden técnico o facultativo de la Dirección Facultativa, no se admitirá reclamación alguna, pudiendo el Contratista salvar su responsabilidad, si lo estima oportuno, mediante una exposición razonada dirigida a la Dirección Facultativa, la cual podrá limitar su contestación al acuse de recibo, que en todo caso será obligatorio para este tipo de reclamaciones.

2.8- Inicio del trabajo

Obligatoriamente y por escrito, deberá el Contratista dar cuenta al Ingeniero Director del comienzo de los trabajos, al menos, 24 horas antes de su iniciación. El Adjudicatario comenzará de manera obligatoria las obras dentro del plazo de 15 días desde la fecha de adjudicación. Dará cuenta al Ingeniero Director del día en que se propone iniciar los trabajos, debiendo este dar acuse de recibo.

El plazo de ejecución de la obra responderá a la planificación realizada por el Cliente y coordinada por el Contratista. Dicha planificación se estima en un mes en función de los plazos de entrega de los equipos y al trabajo de montaje, diseño y configuración. En caso de exceder las previsiones de realización del trabajo, y no siendo esto por causas ajenas al Contratista, no se facturará ningún cargo extra.

El Cliente informará con una antelación mínima de tres días de la disponibilidad de las instalaciones para el comienzo. El Contratista emitirá un informe escrito después de la realización del trabajo al Cliente para su aprobación.

2.9- Replanteo

El Director de las Obras podrá introducir en el Proyecto, antes de empezar las obras o durante su ejecución, aquellas modificaciones que sean necesarias para la construcción de las mismas, aunque estén previstas en el Proyecto.

Todas estas modificaciones serán obligatorias para el Contratista siempre que, con los precios del Contrato, no alteren el Presupuesto de Adjudicación en más de los porcentajes previstos en la Ley de Contratos del Estado y su reglamento de aplicación vigente.

2.10- Ejecución de las obras

El Contratista dará comienzo a las obras dentro de los primeros siete después de la formalización del Contrato, a excepción de que dicha fecha esté determinada en el mismo. La fecha de comienzo así fijada contará a efectos de plazos de ejecución y de revisión de precios en el supuesto de que tal revisión se hubiera pactado.

Junto a su oferta económica, el Contratista presentará un calendario de los trabajos a ejecutar en el que se precisará el tiempo necesario para ejecutar la totalidad de la obra y de cada una de sus correspondientes partes.

2.11- Maquinaria y otros equipos empleados

El Contratista está obligado a situar en las obras los equipos de la maquinaria que se comprometa a aportar en la licitación, y que el director de las obras considere necesario para el correcto desarrollo, siendo necesaria la aprobación de estos por el director.

La maquinaria y demás equipos de trabajo deberán estar en perfectas condiciones de funcionamiento y quedar adscritos a la obra durante el curso de ejecución de las unidades en las que deban utilizarse. Los equipos se ajustarán a las condiciones especificadas desarrolladas para cada uno de ellos en sus correspondientes hojas de especificaciones.

2.12- Puesta a punto y prueba de funcionamiento

Los elementos de la instalación que, por naturaleza y forma de sus condiciones, no tienen necesidad de poner en servicio al conjunto de la instalación serán probados tan pronto como se hayan acabado.

Antes de verificar la recepción provisional, se someterán las obras a pruebas de funcionamiento, consistentes principalmente en pruebas de resistencia, estabilidad e impermeabilidad, además de cualquier otra característica o Propiedad que se considere necesaria de estudio de cada equipo. De igual modo el Contratista procederá a la puesta a punto de la instalación, verificándose, de esta manera, pruebas generales de su funcionamiento y efectividad de tratamiento.

Estas pruebas se efectuarán a pleno caudal de la instalación o de la parte de la misma a la que afecte la prueba. Se comprobará el buen comportamiento en la totalidad de las instalaciones y mecanismos de la instalación. Dichas pruebas son las siguientes:

- Puesta en marcha de las bombas, impulsando agua para asegurarnos que tanto estas como el sistema de control del caudal impulsado y el nivel de llenado de los equipos funcionan correctamente.
- Comprobación de la no existencia de pérdidas de caudal en los tramos de tuberías. Así como se realizará la verificación de la estanqueidad de los equipos utilizando, también, agua para ello.
- Comprobación del buen funcionamiento de los sensores del sistema de control, verificando también los paneles de control.

2.13- Materiales

Todos los materiales que se hayan de emplear en las obras serán suministrados por el Contratista de las mismas, salvo que se exprese lo contrario en los planos o en el Pliego de Condiciones. La Dirección de Obra se reserva el derecho de rechazar los materiales que provengan de lugares cuyos productos no ofrezcan la suficiente. Todos los materiales se manipularán con cuidado, para evitar, así, su deterioro y estropeado.

Si el volumen de la obra, la marcha de la construcción y otras consideraciones lo justifican, el Ingeniero Jefe puede proceder a la inspección del material o de los artículos manufacturados en sus respectivas fuentes. Todos los materiales que no se ajusten a los requisitos del Pliego de Condiciones se considerarán defectuosos y, por ello, se retirarán inmediatamente del lugar de la obra, salvo que el ingeniero ordene lo contrario. Los materiales rechazados, cuyos defectos se hayan corregido, no se utilizarán hasta que no se les haya otorgado la aprobación.

No se procederá al empleo y colocación de los materiales y de los aparatos sin que antes estos sean examinados y aceptados por el Ingeniero Director, en los términos que prescriben los Pliegos de Condiciones, depositando al efecto el Contratista, las muestras y modelos necesarios, previamente bloqueados mediante una contraseña, para efectuar con ellos comprobaciones, ensayos o pruebas preceptuadas en el Pliego de Condiciones vigente en la obra.

2.14- Control de calidad

Cuando lo estime oportuno, la Dirección de Obra ordenará realizar todas aquellas pruebas, ensayos y análisis, que sean necesarias para la comprobación de que las unidades de obra y sus materiales están en las condiciones exigibles y cumplen con lo establecido.

2.15- Ensayos

La Dirección de Obra determinará los materiales que deban ser ensayados antes de su utilización y el tipo y normas de ensayo, así como donde deben realizarse los mismos y el número total de ensayos a efectuar.

El número de ensayos y su frecuencia, tanto sobre materiales como unidades de obras, será fijado por el Director de Obra, y se efectuará atendiendo a las normas que afectan a cada unidad o, en su defecto, a las instrucciones que dicte el Director de Obra.

El Contratista deberá tomar todas las medidas oportunas y necesarias, de las que dará cuenta a la Dirección de Obra, para distinguir los materiales aceptados o rechazados durante los ensayos de recepción. Los materiales rechazados deberán ser evacuados inmediatamente por cuenta del Contratista y repuestos por otros adecuados de forma que no se altere el desarrollo normal de las obras.

2.16- Almacenamiento

El Contratista debe asegurar el almacenamiento de los materiales que tenga a pie de obra, corriendo de su cuenta la reposición de aquellos que presenten defectos, debido a deficiencias de almacenaje, o a otras causas a él imputables. Los daños producidos en los materiales por fenómenos meteorológicos y otras causas externas, tales como los producidos por animales, por vehículos, etc. serán también a cuenta del Contratista.

La Dirección de Obra podrá pedir al Contratista que se realicen ensayos periódicos, principalmente poco tiempo antes de la utilización de aquellos materiales que sean más susceptibles de ser dañados durante el almacenaje. El hecho de haberse realizado los ensayos de recepción correspondientes, no le exime al Contratista de la obligación de subsanar o reponer los materiales deteriorados durante su almacenamiento.

2.17- Mejoras de obra

No se admitirán mejoras de obra, más que en el caso en que el Ingeniero Director haya ordenado por escrito la ejecución de los trabajos nuevos o que mejoren la calidad de los contratados, así como la de los materiales y aparatos previstos en el Contrato. Tampoco se admitirán aumentos en el número de unidades contratadas, salvo caso de error en las mediciones del Proyecto, en los que el Ingeniero Director deberá ordenar, también por escrito, la ampliación de las unidades contratadas.

2.18- Partidas dealzada

Una partida de alzada es una unidad de obra cuyo precio se fija en una cifra arbitraria que es el resultado de una evaluación rigurosa y sistemática, en función de la medición.

Para la ejecución material de las partidas alzadas deberá existir la aprobación de la Dirección de Obra. A tal efecto, antes de proceder a la ejecución, se someterá a su consideración el detalle desglosando del importe de las mismas y, si resultase conforme, podrán realizarse.

2.19- Recepción provisional de las obras

Terminado el periodo de la prueba de funcionamiento con resultados satisfactorios en todos los equipos y unidades, se procederá a la recepción provisional de la forma que dispone de la legislación vigente.

2.20- Periodo de garantías

El Contratista garantiza todas las obras que ejecute, los materiales empleados en ellas y su correcta manipulación. El plazo de garantía será de un año, a no ser que se especifique otro periodo en el Proyecto de Detalle.

2.21- Recepción Definitiva

Durante el primer mes posterior al cumplimiento del plazo de garantía, se procederá a la Recepción Definitiva de las obras.

2.22- Documento final de la obra

El Contratista entregará a la Dirección de Obra, antes de la Recepción Definitiva, tres ejemplares del documento elaborado como final de obra. Dicho documento deberá recoger todas las incidencias ocurridas en la obra desde su inicio hasta su finalización, así como aquellas modificaciones que durante el transcurso de la misma hayan tenido lugar.

3. Condiciones económicas

3.1. Principios generales

Todas las personas que intervienen en el proceso de construcción tienen derecho a percibir puntualmente las cantidades establecidas por su correcta actuación de acuerdo a lo acordado en el Contrato. La Propiedad, el Contratista y, en su caso, los técnicos pueden exigirse recíprocamente las garantías adecuadas al cumplimiento de sus obligaciones de pago.

Por otra parte, todas las unidades de obra se medirán y abonarán por su volumen, superficie, longitud y peso. Si el Contratista construye un mayor volumen del establecido, este exceso no será abonado. Las obras auxiliares, las construcciones rehechas y las herramientas necesarias para la ejecución de las obras correrán a cargo del Contratista.

3.2. Fianzas

El Contratista prestará fianza con arreglo a alguno de los siguientes procedimientos, según se estipule:

- Depósito previo, en metálico o valores, o aval bancario, por importe entre el 3 % y 10 % del precio total de la contrata.
- Mediante retención en las certificaciones parciales o pagos a cuenta en igual proporción.

La fianza retenida será devuelta al Contratista en un plazo que no superior a 30 días una vez firmada el Acta de Recepción Definitiva de la obra. La Propiedad podrá exigir que el Contratista le acredite la liquidación y finiquito de sus deudas causadas por la ejecución de la obra, tales como salarios, suministros y subcontratos.

Si el Contratista se negase a hacer por su cuenta los trabajos precisos para ultimar la obra en las condiciones contratadas, el Director de Obra, en nombre del Propietario, los ordenará ejecutar a un tercero, o, podrá realizarlos directamente por administración, abonando su importe con la fianza depositada, sin perjuicio de las acciones a que tenga derecho el Propietario, en el caso de que el importe de la fianza no bastara para cubrir el importe de los gastos efectuados en las unidades de obra que no fuesen de recibo.

Si la Propiedad, con la conformidad del Director de Obra, accediera a hacer recepciones parciales, tendrá derecho el Contratista a que se le devuelva la parte proporcional de la fianza.

3.3- Precios

3.3.1- Composición de los precios unitarios

Todos los precios unitarios se entienden valorados para cada partida totalmente terminada y, en el caso de equipos y maquinaria funcionando, están comprendidos en ella la parte proporcional de costes de puesta a punto, permisos, licencias, tasas, etc.

El cálculo de los precios de las distintas unidades de obra es el resultado de sumar los costes directos, los indirectos, los gastos generales y el beneficio industrial.

Por un lado, los costes directos son:

- La mano de obra, con sus pluses y cargas y seguros sociales, que interviene directamente en la ejecución de la unidad de obra.
- Los materiales, a los precios resultantes a pie de obra, que queden integrados en la unidad de que se trate o que sean necesarios para su ejecución.
- Los equipos y sistemas técnicos de seguridad e higiene para la prevención y protección de accidentes y enfermedades profesionales.
- Los gastos de personal, combustible, energía, etc., que tengan lugar por el accionamiento o funcionamiento de la maquinaria e instalaciones utilizadas en la ejecución de la unidad de obra.
- Los gastos de amortización y conservación de la maquinaria, instalaciones, sistemas y equipos anteriormente citados.

Por otro, los costes indirectos son:

- Los gastos de instalación de oficinas a pie de obra, comunicaciones, edificación de almacenes, talleres, pabellones temporales para obreros, seguros, etc.
- Los del personal técnico y administrativo adscrito exclusivamente a la obra y los imprevistos. Todos estos gastos, se cifrarán en un porcentaje de los costes directos

Los gastos generales de empresa, gastos financieros, cargas fiscales y tasas de la Administración, legalmente establecidos se cifrarán como un porcentaje de la suma de los costes directos e indirectos.

3.3.2- Precios contradictorios

Se producirán precios contradictorios sólo cuando la Propiedad, por medio del Director de Obra, decida introducir unidades o cambios de calidad en alguna de las previstas, o cuando sea necesario afrontar alguna circunstancia imprevista.

Si ocurriese algún caso excepcional e imprevisto en el que fuese necesaria la determinación de precios contradictorios entre la Propiedad y el Contratista, estos precios deberán aprobarse por la Propiedad a la vista de la propuesta de la Dirección de Obra y de las observaciones del Contratista. Si este no aceptase los precios aprobados quedará libre de ejecutar las nuevas unidades.

3.3.3- Reclamación de aumento de precios

Si el Contratista, antes de la firma del Contrato, no hubiera hecho la observación oportuna, no podrá, bajo ningún pretexto de error u omisión, reclamar aumento de los precios fijados en el cuadro correspondiente del Presupuesto que sirve de base para la ejecución de las obras.

3.3.4- Revisión de los precios contratados

Para realizar la revisión de precios se usarán los últimos índices oficiales de revisión de precios aprobados por la Comisión Delegada de Asuntos Económicos y publicados en el BOE.

3.4- Elementos comprendidos en el Presupuesto

Al fijar los precios de las diferentes unidades de obra en el Presupuesto, se ha tenido en cuenta el importe de todos los correspondientes a medios auxiliares de la construcción (andamios, vallas...), así como toda clase de indemnizaciones, impuestos y multas o pagos que tengan que hacerse por cualquier concepto, con los que se hallen gravados o se graven los materiales o las obras por el Estado, Provincia o Municipio. Por esta razón no se abonará al Contratista cantidad alguna por dichos conceptos.

En el precio de cada unidad de obra también van comprendidos los materiales y operaciones necesarias para dejar la obra completamente terminada y en disposición de recibirse.

3.5- Valoración y abono de los trabajos

Según la modalidad elegida para la contratación de las obras y a excepción de que en el Pliego de Condiciones Económicas se preceptúe otra cosa, el abono de los trabajos se efectuará de la siguiente manera:

- Tipo fijo o tanto alzado total. Se abonará la cifra previamente fijada como base de la adjudicación, disminuida en su caso en el importe de baja efectuada por el adjudicatario.
- Tipo fijo o tanto alzado por unidad de obra, cuyo precio invariable se haya fijado de antemano, pudiendo variar solamente el número de unidades ejecutadas. Previa medición y aplicando al total de las diversas unidades de obra ejecutadas, del precio invariable estipulado de antemano para cada una de ellas, se abonará al Contratista el importe de las comprendidas en los trabajos ejecutados y ultimados con arreglo y sujeción a los documentos que constituyen el Proyecto, los que servirán de base para la medición y valoración de las diversas unidades.
- Tanto variable por unidad de obra, según las condiciones en que se realice y los materiales autorizados en la forma que el presente "Pliego General de Condiciones Económicas" determina. Se abonará al Contratista en idénticas condiciones al caso anterior.
- Por listas de jornales y recibos de materiales, autorizados en la forma que el presente "Pliego General de Condiciones Económicas" determina.
- Por horas de trabajo, ejecutado en las condiciones determinadas en el Contrato.

3.6- Indemnizaciones por demora

La indemnización por retraso en la terminación se establecerá en un tanto por mil del importe total de los trabajos contratados, por cada día natural de retraso, contados a partir del día de terminación fijado en el Calendario de obra. Las sumas resultantes se descontarán y retendrán con cargo a la fianza.

3.7- Penalizaciones

Si finalizado el plazo de ejecución de las obras, éstas no hubieran terminado sin motivo justificado, se aplicarán los siguientes recargos a imputar al Contratista desde la fecha de finalización de las obras:

- Por día natural de retraso, un 0,1% del total de los trabajos contratados, hasta el día 30.
- A partir del día 31 hasta el día 60 la penalización por día natural de retraso será de un 0,5% del valor al que ascienda la fianza.

Pasados estos plazos se rescindirá el Contrato quedando obligado el Contratista a responder por daños y perjuicios a esta entidad. De igual manera se actuará en caso de que se dé incumplimiento del Contrato por parte del Contratista.

3.8- Gastos de obra

Los gastos de obra que correrán por cuenta del promotor salvo que se indique en Contrato serán los gastos referentes a licencia de obras, honorarios de Proyecto y Dirección Facultativa, así como todos los originados para dotar a la obra de acometidas de agua, electricidad, etc.

3.9- Seguros y conservación de la obra

El Contratista actuará siempre en función de los mejores intereses de la Propiedad y protegerán en toda su capacidad la Propiedad, equipo y herramientas de este último.

El Contratista mantendrá en vigor, y a su costa, durante el periodo de construcción y de pruebas, los siguientes seguros:

- De accidente de trabajo y demás seguros sociales del personal contratado, según la legislación vigente.
- De daños que puedan sufrir las obras provisionales realizadas durante el periodo de construcción y de pruebas, incluyéndose la cobertura de riesgos catastróficos.
- Seguro obligatorio de vehículos a motor, propio o contratados que intervengan en los trabajos de construcción a todo riesgo, con garantía de responsabilidad civil limitada.

3.10- Condiciones de pago

Los pagos se harán mensualmente por el 100% del importe de la certificación aprobada respecto a unidades de obra completadas correspondiente al mes anterior.

Las cantidades retenidas serán reintegradas por la Propiedad al Contratista una vez cumplido el plazo de garantía, siempre que no se haya observado ningún defecto en la ejecución de los trabajos realizados, mala calidad de los materiales utilizados y se haya firmado el acta de Recepción Definitiva.

4- Condiciones legales

4.1- Disposiciones legales

Se recogen las siguientes disposiciones legales:

- Ordenanza General de Seguridad e Higiene en el Trabajo y Plan Nacional de Higiene y Seguridad del Trabajo (O.M. 09-03-1971).
- Comité de Seguridad e Higiene en el Trabajo (Decreto 432/71 02-03-1971).
- Reglamento de Seguridad e Higiene en la Industrias de la Construcción (O.M. 23-09-1966).
- Real Decreto 843/2011 de los Servicios Médicos de Empresa.
- Real Decreto 842/2002 de Electrotécnico de Líneas Baja Tensión.
- Real Decreto 223/2008 de Líneas Eléctricas Aéreas de Alta Tensión.
- Convenio Colectivo Provincial del Sector de la Construcción y Estatuto de los Trabajadores (28 de febrero de 2012).
- Real Decreto 1627/1997 de obligatoriedad de la Inclusión en un Estudio de Seguridad e Higiene en el Trabajo de los Proyectos de Edificación.
- Las normas y leyes que estén en vigor en el momento.

También es de cumplimiento obligado cuanto la Dirección de Obra dicte encaminado a garantizar la seguridad de los obreros y de la obra en general.

En el caso de ejecución de este Proyecto, se aplicará, siempre, la normativa vigente con independencia de la especificada en cualquiera de los documentos.

4.2- El Contratista

El Contratista, con carácter general, está obligado a ejecutar todas las obras que se le confían, así como a cumplir todas las condiciones estipuladas en el Pliego y en el Contrato. El Contratista deberá acreditar su capacidad técnica para la realización de la obra ante la Propiedad mediante la información que se detalla a continuación:

- Lista de obras realizadas.
- Lista de equipamiento y maquinarias.
- Personal a emplear.

Esta documentación debe ser de conformidad de la Propiedad y constituirá una razón para la denegación de la obra.

El Contratista será el único responsable de la calidad y buena ejecución de las obras, no teniendo derecho a indemnización alguna por el mayor precio que pudieran costarle, ni por las operaciones fallidas que cometiera durante la construcción, siendo a su cuenta y riesgo independientemente de la inspección que de ellas haya podido haber hecho el Director Técnico de la obra. El Contratista está obligado a adoptar todas las medidas de seguridad que las disposiciones vigentes preceptúan, con el fin de evitar, en la medida de lo posible accidentes a los obreros. Así mismo, será responsable ante los tribunales de los accidentes que, por inexperiencia o descuido, sobrevinieran en el trascurso de las obras, debiendo atenerse en todo a las normas de prudencia, así como a las disposiciones y Reglamentos de Policía de la materia.

El Contratista proporcionará a la Dirección Técnica toda clase de facilidades para el replanteo, reconocimiento, mediciones, pruebas de materiales e inspecciones visuales de la ejecución de todas las unidades de obra, con objeto de comprobar el cumplimiento de las condiciones exigibles.

El Contratista, además, será el único responsable por el pago de todos los impuestos, derechos, tasas, contribuciones y cargas sociales previstos por las leyes del país donde se ejecute la obra, por lo que tiene la obligación de ser conocedor de las mismas. Se considera que todos los precios consignados en la oferta cubren los pagos de los mismos sin excepción alguna.

4.3- Leyes laborales

El Contratista está obligado a cumplir rigurosamente la legislación vigente. Igualmente, está obligado a tener a todo el personal a sus órdenes debidamente asegurado.

4.4- Mano de obra

El Contratista deberá tener siempre en obra un número de operarios proporcional a la extensión y clase de los trabajos a juicio de la Dirección Técnica. Estos serán de aptitud reconocida experimentados en su oficio y en todo momento habrá en obra un técnico o encargado apto que vigile e interprete los planos, y haga cumplir las órdenes de la Dirección y cuanto en este Pliego se especifica.

4.5- Daños en Propiedades vecinas

Si con motivo de las obras, se causara algún desperfecto en las Propiedades colindantes, el Contratista tendrá que repararla por su cuenta. Así mismo, adoptará cuantas medidas sean necesarias para evitar la caída de materiales o herramientas que puedan ser motivo de accidente alguno.

4.6- Contrato

El Contrato se firmará dentro de los 10 primeros días de notificación de la adjudicación.

4.6.1- Rescisión de Contrato

La rescisión, si se produjera, se regirá por el Reglamento General de Contratación para Aplicación de la Ley de Contratos de Estado, por el Pliego de Cláusulas Administrativas Generales y otras disposiciones vigentes.

El Contrato solo puede ser rescindido por faltas graves del Contratista. Si se diera este caso, el promotor deberá comunicar al Contratista que desea rescindir el Contrato y tratar de acordar con el Contratista la rescisión. Si el acuerdo es afirmativo, el Contratista tendrá derecho a una indemnización donde se cubran todos los gastos producidos hasta ese momento. Si el acuerdo no es afirmativo, los abogados de ambas partes deberán acordar la rescisión.

Serán causas suficientes de rescisión las siguientes:

- Muerte o incapacitación del Contratista.
- Quiebra del Contratista.
- Alteraciones del Contrato por las causas siguientes:
 - Modificación del Proyecto en forma tal que represente alteraciones fundamentales a juicio del Director de Obra, y siempre que la variación del Presupuesto sea de $\pm 25\%$ como mínimo de su importe.
 - Variaciones en las unidades de obra en $\pm 40\%$.
 - Suspensión de la obra comenzada.
 - Incumplimiento de las condiciones del Contrato, cuando implique descuido o mala fe con perjuicio de los intereses de las obras.
 - Abandono de la obra sin causa justificada.

4.6.2- Formalizaciones del Contrato

La formalización del Contrato se verificará gracias a un documento privado con el compromiso por ambas partes, Propiedad y Contratista de elevarlo a Documento Público a petición de cualquiera de ellos, como complemento del Contrato, los Planos y demás documentos del Proyecto irán firmados por ambos.

4.7- Adjudicación

La forma de adjudicación será mediante subasta cerrada. Las ofertas serán evaluadas sobre la base de las condiciones legales, técnicas, económicas y financieras establecidas en las mismas.

A los efectos de formular el ordenamiento prioritario de las ofertas con vistas a la adjudicación, se considerarán los siguientes aspectos:

- Documentación técnica.
- Condiciones económica-financieras.
- Precio final.
- Tiempo de ejecución de la obra.

4.8- Subcontratas

El Contratista no subcontratará ni se asociará a terceros para la ejecución del trabajo sin aprobación previa por escrito de la Propiedad. Esta aprobación no eximirá al Contratista de sus responsabilidades ni de sus obligaciones derivadas del Contrato.

4.9- Accidentes de trabajo

Para prevenir posibles accidentes laborales, el Contratista cumplirá con las disposiciones de la Ley 31/1995 (8 de noviembre) de Prevención de Riesgos Laborales, considerando su última modificación del 29 de diciembre de 2014, así como las normas de seguridad de la Propiedad, ya sean generales o particulares.

5- Condiciones técnicas

Las prescripciones técnicas particulares son aquellas en las que se hace una descripción de los materiales, equipos y obras que van a realizarse en el Proyecto, así como la forma de ejecución de las mismas. También se indicarán en ellas las obligaciones de orden técnico que correspondan al Contratista y al Director Técnico.

5.1- Disposiciones de carácter particular

Las disposiciones de carácter particular y de ámbito técnico son:

- Normativa de la Asociación Española de Normalización (AENOR).
- Normas de tecnología de la Edificación:
 - Instalaciones de fontanería. Abastecimiento (IFA).
 - Instalaciones de salubridad. Alcantarillado (ISA).
 - Instalaciones eléctricas. Puesta en tierra (JET).

5.2- Materiales de construcción

Todos los materiales que se empleen en la construcción, han de cumplir las normas que se encuentran en el Catálogo de Normas UNE de 1992. Además, estos materiales serán sometidos a pruebas o análisis por cuenta de la contrata que se crean necesarios para acreditar su calidad. Por lo que aquel material que a razón de la Dirección Técnica no reúna las condiciones exigidas será rechazado.

5.3. Materiales para la fabricación de equipos

Para la materialización del presente Proyecto, salvo los fotobiorreactores, el resto de equipos serán adquiridos a empresas homologadas cuyos productos están sujetos a las normativas especificadas anteriormente. Los fotobiorreactores que se emplearán serán elaborados con metacrilato y una base de PVC. No obstante, no ha de dejarse de lado, que para otras instalaciones, tales como red de agua, aire o eléctrica, puedan utilizarse otros materiales.

Las diferentes normas a las que están sujetos los materiales para la fabricación de los equipos y ensayos de estos materiales son:

- UNE-EN 13311-4:2001: Biotecnología. Criterios de funcionamiento de los recipientes. Parte 4: Biorreactores.

- UNE-EN ISO 8257-1:2006: Plásticos. Materiales de poli(metacrilato de metilo) (PMMA) para moldeo y extrusión. Parte 1: Sistema de designación y bases para las especificaciones (ISO 8257-1:1998)
- UNE-EN ISO 8257-2:2006: Plásticos. Materiales de poli(metacrilato de metilo) (PMMA) para moldeo y extrusión. Parte 2: Preparación de probetas y determinación de Propiedades (ISO 8257-2:2001)
- UNE-EN 13598-2:2017: Sistemas de canalización en materiales plásticos para saneamiento y evacuación enterrados sin presión. Poli(cloruro de vinilo) no plastificado (PVC-U), polipropileno (PP) y polietileno (PE). Parte 2: Especificaciones para los pozos de registro y arquetas de inspección.
- UNE-EN 13598-1:2011: Sistemas de canalización en materiales plásticos para saneamiento y evacuación enterrados sin presión. Poli(cloruro de vinilo) no plastificado (PVC-U), polipropileno (PP) y polietileno (PE). Parte 1: Especificaciones para los accesorios auxiliares incluyendo las arquetas de inspección poco profundas.
- UNE-EN 1401-1:2009: Sistemas de canalización en materiales plásticos para saneamiento enterrado sin presión. Poli(cloruro de vinilo) no plastificado (PVC-U). Parte 1: Especificaciones para tubos, accesorios y el sistema.
- UNE 53331:1997 IN: Plásticos. Tuberías de poli(cloruro de vinilo) (PVC) no plastificado y polietileno (PE) de alta y media densidad. Criterio para la comprobación de los tubos a utilizar en conducciones con y sin presión sometidos a cargas externas.
- UNE-EN ISO 1452-2:2010: Sistemas de canalización en materiales plásticos para conducción de agua y para saneamiento enterrado o aéreo con presión. Poli(cloruro de vinilo) no plastificado (PVC-U). Parte 2: Tubos. (ISO 1452-2:2009).
- UNE-EN 13476-1:2018: Sistemas de canalización en materiales plásticos para evacuación y saneamiento enterrado sin presión. Sistemas de canalización de pared estructurada de poli(cloruro de vinilo) no plastificado (PVC-U), polipropileno (PP) y polietileno (PE). Parte 1: Requisitos generales y características de funcionamiento.
- UNE-EN ISO 1452-5:2011: Sistemas de canalización en materiales plásticos para conducción de agua y para saneamiento enterrado o aéreo con presión.

- Poli(cloruro de vinilo) no plastificado (PVC-U). Parte 5: Aptitud al uso del sistema. (ISO 1452-5:2009, versión corregida 2010-03-01).
- UNE-EN ISO 1452-3:2011: Sistemas de canalización en materiales plásticos para conducción de agua y para saneamiento enterrado o aéreo con presión. Poli(cloruro de vinilo) no plastificado (PVC-U). Parte 3: Accesorios (ISO 1452-3:2009, versión corregida 2010-03-01).
 - UNE-EN ISO 15877-2:2009/A1:2011: Sistemas de canalización en materiales plásticos para instalaciones de agua caliente y fría. Poli(cloruro de vinilo) clorado (PVC-C). Parte 2: Tubos. Modificación 1. (ISO 15877-2:2009/AMD 1:2010).
 - UNE-EN ISO 15877-2:2009: sistemas de canalización en materiales plásticos para instalaciones de agua caliente y fría. Poli(cloruro de vinilo) clorado (PVC-C). Parte 2: Tubos. (ISO 15877-2:2009).
 - UNE-EN ISO 15877-1:2009/A1:2011: Sistemas de canalización en materiales plásticos para instalaciones de agua caliente y fría. Poli(cloruro de vinilo) clorado (PVC-C). Parte 1: Generalidades. Modificación 1. (ISO 15877-1:2009/AMD 1:2010)
 - UNE-EN ISO 15877-1:2009: Sistemas de canalización en materiales plásticos para instalaciones de agua caliente y fría. Poli(cloruro de vinilo) clorado (PVC-C). Parte 1: Generalidades. (ISO 15877-1:2009)
 - UNE-EN ISO 1452-4:2010: Sistemas de canalización en materiales plásticos para conducción de agua y para saneamiento enterrado o aéreo con presión. Poli(cloruro de vinilo) no plastificado (PVC-U). Parte 4: Válvulas. (ISO 1452-4:2009).
 - UNE-ENV 1452-6:2002 ERRATUM:2006: Sistemas de canalización en materiales plásticos para conducción de agua. Poli(cloruro de vinilo) no plastificado (PVC-U). Parte 6: Práctica recomendada para la instalación.
 - UNE 14618:2000 Inspectores de soldadura. Cualificación y certificación.
 - UNE 48103:2002 Pinturas y barnices. Colores normalizados.
 - UNE-EN ISO 10666:2000 Tornillos autotaladrantes y autorroscantes. Características mecánicas y funcionales (ISO 10666:1999).
 - UNE-EN ISO 10684:2006/AC:2009 Elementos de fijación. Recubrimientos por galvanización en caliente (ISO 10684:2004/Cor 1:2008)

- UNE-EN ISO 12944-1:1999 Pinturas y barnices. Protección de estructuras de acero frente a la corrosión mediante sistemas de pintura protectores. Parte 1: Introducción general. (ISO 12944-1:1998).
- UNE-EN ISO 12944-2:1999 Pinturas y barnices. Protección de estructuras de acero frente a la corrosión mediante sistemas de pintura protectores. Parte 2: Clasificación de ambientes. (ISO 12944-2:1998).
- UNE-EN ISO 12944-3:1999 Pinturas y barnices. Protección de estructuras de acero frente a la corrosión mediante sistemas de pintura protectores. Parte 3: Consideraciones sobre el diseño. (ISO 12944-3:1998).
- UNE-EN ISO 12944-4:1999 Pinturas y barnices. Protección de estructuras de acero frente a la corrosión mediante sistemas de pintura protectores. Parte 4: Tipos y preparación de superficies. (ISO 12944-4:1998).
- UNE-EN ISO 12944-5:2008 Pinturas y barnices. Protección de estructuras de acero frente a la corrosión mediante sistemas de pintura protectores. Parte 5: Sistemas de pintura protectores. (ISO 12944-5:2007).
- UNE-EN ISO 12944-6:1999 Pinturas y barnices. Protección de estructuras de acero frente a la corrosión mediante sistemas de pintura protectores. Parte 6: Ensayos de comportamiento en laboratorio. (ISO 12944-6:1998).
- UNE-EN ISO 12944-7:1999 Pinturas y barnices. Protección de estructuras de acero frente a la corrosión mediante sistemas de pintura protectores. Parte 7: Ejecución y supervisión de trabajos de pintado. (ISO 12944-7:1998).
- UNE-EN ISO 12944-8:1999 Pinturas y barnices. Protección de estructuras de acero frente a la corrosión mediante sistemas de pintura protectores. Parte 8: Desarrollo de especificaciones para trabajos nuevos y mantenimiento. (ISO 12944-8:1998).
- UNE-EN ISO 14001:2004/AC:2009 Sistemas de gestión ambiental. Requisitos con orientación para su uso. (ISO 14001:2004/Cor 1:2009).
- UNE-EN ISO 14713-1:2011 Directrices y recomendaciones para la protección frente a la corrosión de las estructuras de hierro y acero. Recubrimientos de cinc. Parte 1: Principios generales de diseño y resistencia a la corrosión. (ISO 14713-1:2009).
- UNE-EN ISO 14713:2000 Protección frente a la corrosión de las estructuras de hierro y acero. Recubrimientos de cinc y aluminio. Directrices. (ISO 14713:1999).

- UNE-EN ISO 14713-2:2011 Directrices y recomendaciones para la protección frente a la corrosión de las estructuras de hierro y acero. Recubrimientos de cinc. Parte 2: Galvanización en caliente. (ISO 14713-2:2009)
- UNE-EN ISO 1716:2002 Ensayos de reacción al fuego de los productos de construcción. Determinación del calor de combustión. (ISO 1716:2002)
- UNE-EN ISO 1716:2011 Ensayos de reacción al fuego de productos. Determinación del calor bruto de combustión (valor calorífico). (ISO 1716:2010)
- UNE-EN ISO 17635:2010 Ensayo no destructivo de uniones soldadas. Reglas generales para los materiales metálicos. (ISO 17635:2010)
- UNE-EN ISO 2063:2005 Proyección térmica. Recubrimientos metálicos y otros recubrimientos inorgánicos. Cinc, aluminio y sus aleaciones (ISO 2063:2005)
- UNE-EN ISO 23277:2010 Ensayo no destructivo de uniones soldadas. Ensayo de uniones soldadas mediante líquidos penetrantes. Niveles de aceptación. (ISO 23277:2006)
- UNE-EN ISO 286-2:2011 Especificación geométrica de productos (GPS). Sistema de codificación ISO para las tolerancias en dimensiones lineales. Parte 2: Tablas de las clases de tolerancia normalizadas y de las desviaciones límite para agujeros y ejes. (ISO 286-2:2010)
- UNE-EN ISO 6507-1:2006 Materiales metálicos. Ensayo de dureza Vickers. Parte 1: Método de ensayo (ISO 6507-1:2005).
- UNE-EN ISO 6507-1:2006 ERRATUM:2011 Materiales metálicos. Ensayo de dureza Vickers. Parte 1: Método de ensayo. (ISO 6507-1:2005).
- UNE-EN ISO 6520-1:2009 Soldeo y técnicas afines. Clasificación de las imperfecciones geométricas en los materiales metálicos. Parte 1: Soldeo por fusión (ISO 6520-1:2007)
- UNE-EN ISO 8501-1:2008 Preparación de sustratos de acero previa a la aplicación de pinturas y productos relacionados. Evaluación visual de la limpieza de las superficies. Parte 1: Grados de óxido y de preparación de sustratos de acero no pintados después de eliminar totalmente los recubrimientos anteriores. (ISO 8501-1:2007)
- UNE-EN ISO 898-1:2010 ERRATUM:2011 Características mecánicas de los elementos de fijación de acero al carbono y acero aleado. Parte 1: Pernos, tornillos y bulones con clases de calidad especificadas. Rosca de paso grueso y rosca de paso fino. (ISO 898-1:2009)

- UNE-EN ISO 9001:2008/AC:2009 Sistemas de gestión de la calidad. Requisitos. (ISO 9001:2008/Cor 1:2009)
- UNE-EN ISO/IEC 17021:2006 Evaluación de la conformidad. Requisitos para los organismos que realizan la auditoría y la certificación de sistemas de gestión (ISO/IEC 17021:2006)
- UNE-EN ISO/IEC 17021:2011 Evaluación de la conformidad. Requisitos para los organismos que realizan la auditoría y la certificación de sistemas de gestión. (ISO/IEC 17021:2011)
- UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 ERRATUM:2006 Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. (ISO/IEC 17025:2005/Cor. 1:2006)
- UNE-EN 1289/1M:2002 Ensayo no destructivo de uniones soldadas. Ensayo mediante líquidos penetrantes de uniones soldadas. Niveles de aceptación.
- UNE-EN 1289:1998 Examen no destructivo de soldaduras. Ensayo de soldaduras por líquidos penetrantes. Niveles de aceptación.
- UNE-EN 1289:1998/A2:2006 Ensayo no destructivo de uniones soldadas. Ensayo mediante líquidos penetrantes de uniones soldadas. Niveles de aceptación.
- UNE-EN 1290/1M:2002 Ensayo no destructivo de uniones soldadas. Ensayo de uniones soldadas mediante partículas magnéticas.
- UNE-EN 1363-1:2000 ERRATUM:2011 Ensayos de resistencia al fuego. Parte 1: Requisitos generales.
- UNE-EN 1363-2:2000 Ensayos de resistencia al fuego. Parte 2: Procedimientos alternativos y adicionales.
- UNE-EN 15048-1:2008 Uniones atornilladas estructurales sin precarga. Parte 1: Requisitos generales.
- UNE-EN 15048-2:2008 Uniones atornilladas estructurales sin precarga. Parte 2: Ensayo de aptitud.
- UNE-EN 1714:1998/A2:2006 Ensayo no destructivo de soldaduras. Ensayo ultrasónico de uniones soldadas.
- UNE-EN 1990:2003 Eurocódigos. Bases de cálculo de estructuras.
- UNE-EN 1990:2003/A1:2010 Eurocódigos. Bases de cálculo de estructuras.

- UNE-EN 1991-1-1:2003 Eurocódigo 1: Acciones en estructuras. Parte 1-1. Acciones generales. Pesos específicos, pesos propios, y sobrecargas de uso en edificios.
- UNE-EN 1991-1-1:2003/AC:2010 Eurocódigo 1: Acciones en estructuras. Parte 1-1. Acciones generales. Pesos específicos, pesos propios, y sobrecargas de uso en edificios.
- UNE-EN 1991-1-2:2004 Eurocódigo 1: Acciones en estructuras. Parte 1-2: Acciones generales. Acciones en estructuras expuestas al fuego.
- UNE-EN 1991-1-2:2004/AC:2010 Eurocódigo 1: Acciones en estructuras. Parte 1-2: Acciones generales. Acciones en estructuras expuestas al fuego.
- UNE-EN 1991-1-5:2004 Eurocódigo 1: Acciones en estructuras. Parte 1-5: Acciones generales. Acciones térmicas
- UNE-EN 1991-1-5:2004/AC:2010 Eurocódigo 1: Acciones en estructuras. Parte 1-5: Acciones generales. Acciones térmicas.
- UNE-EN 1991-1-6:2010 Eurocódigo 1: Acciones en estructuras. Parte 1-6: Acciones generales. Acciones durante la ejecución.
- UNE-EN 1991-1-7:2010 Eurocódigo 1: Acciones en estructuras. Parte 1-7: Acciones generales. Acciones accidentales.
- UNE-EN 1993-1-10:2009 Eurocódigo 3: Proyecto de estructuras de acero. Parte 1-10: Tenacidad de fractura y resistencia transversal.
- UNE-EN 1993-1-1:2008 Eurocódigo 3: Proyecto de estructuras de acero. Parte 1-1: Reglas generales y reglas para edificios.
- UNE-EN 1993-1-1:2008/AC:2010 Eurocódigo 3: Proyecto de estructuras de acero. Parte 1-1: Reglas generales y reglas para edificios.
- UNE-EN 1993-1-12:2010 Eurocódigo 3. Proyecto de estructuras de acero. Parte 1-12: Reglas adicionales para la aplicación de la Norma EN 1993 hasta aceros de grado S700.
- UNE-EN 1993-1-2:2011 Eurocódigo 3: Proyecto de estructuras de acero. Parte 1-2: Reglas generales. Proyecto de estructuras sometidas al fuego
- UNE-EN 1993-1-5:2011 Eurocódigo 3: Proyecto de estructuras de acero. Parte 1-5: Placas planas cargadas en su plano
- UNE-EN 1993-1-8:2011 Eurocódigo 3: Proyecto de estructuras de acero. Parte 1-8: Uniones.

- UNE-EN 1993-1-9:2008 Eurocódigo 3: Proyecto de estructuras de acero. Parte 1-9: Fatiga.
- UNE-EN 1993-1-9:2008 ERRATUM:2011 Eurocódigo 3: Proyecto de estructuras de acero. Parte 1-9: Fatiga.
- UNE-EN 1994-1-1:2011 Eurocódigo 4: Proyecto de estructuras mixtas de acero y hormigón. Parte 1-1: Reglas generales y reglas para edificación.
- UNE-EN 1994-1-2:2011 Eurocódigo 4: Proyecto de estructuras mixtas de acero y hormigón. Parte 1-2: Reglas generales. Proyecto de estructuras sometidas al fuego.
- UNE-EN 1996-1-1:2011 Eurocódigo 6: Proyecto de estructuras de fábrica. Parte 1-1: Reglas generales para estructuras de fábrica armada y sin armar.
- UNE-EN 1996-1-2:2011 Eurocódigo 6: Proyecto de estructuras de fábrica. Parte 1-2: Reglas generales. Proyecto de estructuras sometidas al fuego.
- UNE-EN 1996-2:2011 Eurocódigo 6: Proyecto de estructuras de fábrica. Parte 2: Consideraciones de Proyecto, selección de materiales y ejecución de la fábrica.
- UNE-EN 1996-3:2011 Eurocódigo 6: Proyecto de estructuras de fábrica. Parte 3: Métodos simplificados de cálculo para estructuras de fábrica sin armar.
- UNE-EN 1997-1:2010 Eurocódigo 7: Proyecto geotécnico. Parte 1: Reglas generales.
- UNE-EN 1998-1:2011 Eurocódigo 8: Proyecto de estructuras sismorresistentes. Parte 1: Reglas generales, acciones sísmicas y reglas para edificación
- UNE-EN 1998-5:2011 Eurocódigo 8: Proyecto de estructuras sismorresistentes. Parte 5: Cimentaciones, estructuras de contención y aspectos geotécnicos.
- UNE-EN 20286-2:1996 Sistema ISO de tolerancias y ajustes. Parte 2: Tablas de los grados de tolerancia normalizados y de las desviaciones límite de los agujeros y de los ejes. (ISO 286-2:1988).
- UNE-EN 20898-2:1994 Características mecánicas de los elementos de fijación. Parte 2: tuercas con valores de carga de prueba especificados. Rosca de paso grueso. (ISO 898-2:1992). (Versión oficial EN 20898-2:1993).
- UNE-EN 45011:1998 Requisitos generales para entidades que realizan la certificación de producto. (Guía ISO/CEI 65:1996).
- UNE-EN 970:1997 Examen no destructivo de soldaduras por fusión. Examen visual.

- UNE-ENV 13381-2:2004 Ensayos para determinar la contribución a la resistencia al fuego de los elementos estructurales. Parte 2: Membranas protectoras verticales.
- UNE-ENV 13381-4:2005 Ensayos para determinar la contribución a la resistencia al fuego de los elementos estructurales. Parte 4: Protección aplicada a elementos de acero.
- UNE-ENV 1363-3:2000 Ensayos de resistencia al fuego. Parte 3: Verificación del comportamiento del horno.
- UNE-ENV 1997-2:2001 Eurocódigo 7: Proyecto geotécnico. Parte 2: Proyecto asistido por ensayos de laboratorio.
- UNE-ENV 1997-3:2002 Eurocódigo 7: Proyecto geotécnico. Parte 3: Proyecto asistido por ensayos de campo.
- UNE-ENV 1998-3:2000 Eurocódigo 8: Disposiciones para el Proyecto de estructuras sismorresistentes. Parte 3: Torres, mástiles y chimeneas.
- UNE-ENV 1998-4:2004 Eurocódigo 8: Disposiciones para el Proyecto de estructuras sismorresistentes. Parte 4: Silos, depósitos y tuberías.

5.4- Equipos y maquinarias

Las normas a las que se encuentran sujetos todos los equipos y la maquinaria se encuentran también en el catálogo de Normas UNE de 1992.

5.5- Condiciones de ejecución

Las condiciones de ejecución, condiciones funcionales de los materiales y equipos industriales, control de la ejecución, seguridad en el trabajo, medición, valoración y mantenimiento serán establecidos en las normas NBE y NTE, así como las correspondientes a equipos, materiales o maquinaria.

5.6- Especificaciones particulares de los equipos

El objeto del presente apartado, es concretar las especificaciones técnicas que deben satisfacer los distintos equipos, diseñados o de adquisición directa por compra, para que sean aceptados en la instalación que se proyecta.

Los equipos deben entregarse con las pruebas hidráulicas que correspondan, realizadas de forma satisfactoria. La instalación solo será recepcionada cuando se compruebe que todos los equipos y sistemas funcionan correctamente. Las especificaciones de los equipos se clasifican en:

- Especificaciones de los fotobiorreactores para el crecimiento.
- Especificaciones de los fotobiorreactores para el estresado.
- Especificaciones de las bombas
- Especificaciones de la centrífuga
- Especificaciones del liofilizador
- Especificaciones de las lámparas UVB para el estresado
- Especificaciones de los depósitos
- Especificaciones del sistema de esterilización
- Especificaciones del compresor de aire

5.6.1- Fotobiorreactores para el crecimiento de la biomasa

Consiste en un conjunto de 38 fotobiorreactores tipo airlift dispuestos en 4 filas paralelas, la primera y la tercera con 10 fotobiorreactores cada una; y la segunda y la cuarta, con nueve.

Cada biorreactor tendrá una altura de 2 metros y un diámetro de 20 cm, constituyendo un volumen útil de 60 litros. Estarán realizados de polimetacrilato con una base de PVC. Presentan un sistema de aireación gracias a un difusor.

5.6.2- Fotobiorreactores de estresado

Son un total de 10 fotobiorreactores de columna vertical de burbujeo con unas dimensiones de 2 metros de alto y un diámetro de 16 cm. Realizados del mismo material que los otros fotobiorreactores y precisan también de un sistema de aireación mediante un difusor.

5.6.3- Bombas

Cada reactor de estresado precisará una bomba peristáltica de la compañía Peribest, modelo I12 o I17, con caudales mínimos de trabajo requeridos de 100 L/h. Es necesaria la utilización de otras dos bombas centrífugas, de la compañía Hasa, modelo Niza 4.4., capaces de impulsar un mayor caudal.

5.6.4- Centrífuga

La centrífuga empleada es seleccionada del catálogo de la compañía Alfa Laval, eligiendo el modelo BTPX 305, siendo adecuada para procesos de carácter biotecnológico.

5.6.5- Liofilizador

El modelo ha sido seleccionado de catálogo de la compañía CoolVacuum Technologies, optando por el equipo Lyolab 0.3.

5.6.6- Lámparas UVB para el estresado

El modelo seleccionado para el estresado celular es de catálogo y pertenece a la compañía Philips. El modelo que mejor se ajusta a las especificaciones requeridas es el UV PL-L 36W/01/4P1CT/25 con un máximo de emisión en los 311 nm.

5.6.7- Especificaciones de los depósitos

Los depósitos para el almacenamiento del medio de cultivo tienen un diámetro de 1,4 metros y una altura de 1,7 metros. Su volumen es de 2150 L. Son seleccionados del catálogo de la compañía Tapidol S.L. y están contruidos de Poliéster Reforzado con Fibra de Vidrio.

5.6.8- Especificaciones del sistema de esterilización

El sistema de esterilización es una lámpara de UV con un máximo de emisión en los 254 nm de longitud de onda. Está conectada a los tanques de almacenamiento y el equipo que contiene las lámparas tiene una longitud de 92 cm y un diámetro de 6,5 cm. El modelo ha sido seleccionado del catálogo de la compañía Polaris: modelo UVA-12.

5.6.9- Compresor de aire

Equipo para el aporte de CO₂ seleccionado del catálogo de la compañía CEVIK. El modelo seleccionado es el ProSilent 24, con un caudal volumétrico máximo de 160 L/h y un máximo de 62 dB.

DOCUMENTO V: PRESUPUESTOS

1. Introducción

Este documento persigue el objetivo de estimar los costes totales para la implantación y materialización del Proyecto “Diseño y validación de un método no invasivo para la determinación del factor de protección de cremas solares. Fabricación de una crema a partir de microalgas y el diseño de su proceso de producción”.

Para la elaboración del presupuesto se tendrá en cuenta el coste de todas las unidades necesarias para el correcto desarrollo del proceso de producción y obtención de biomasa microalgal seca en las condiciones adecuadas y estipuladas. A esta cantidad se le denomina costes de inmovilizado.

Para la materialización del presente Proyecto, además de los costes de inmovilizado es necesario tener en cuenta los costes directos e indirectos derivados del montaje de la planta de producción.

2. Presupuesto de Ejecución Material (PEM)

El Presupuesto de Ejecución Material (PEM) es el importe del coste de los materiales y de la mano de obra, necesarios para la ejecución de una obra. Se calcula multiplicando la medición por el precio unitario de cada unidad de obra.

Los costes de los equipos necesarios para el proceso de producción se han obtenido de tres maneras diferentes:

- A partir de catálogos de los equipos o accesorios, proporcionados por las empresas, en los que figura el precio.
- Poniéndonos en contacto directamente con el fabricante. En este caso, nos han proporcionado precios aproximados. Estos productos vendrán marcados por un asterisco para indicar que no son exactos.
- Por comparación con el precio de equipos similares, de los que sí se conoce el valor exacto de estos. En este caso, para el cálculo del precio del equipo de interés se ha de utilizar la siguiente ecuación:

$$C_{t1} = C_{t0} * \left(\frac{V_{t1}}{V_{t0}}\right)^{0,6} \quad (22)$$

En la que:

- C_{t1} : coste del equipo del que se quiere conocer el precio
- C_{t0} : coste del equipo conocido
- V_{t1} : volumen o capacidad de trabajo del equipo del que se quiere conocer el precio (esta característica es conocida)
- V_{t0} : volumen o capacidad de trabajo del equipo del que se conoce el precio.

A continuación, se recogen en una tabla, los costes de inmovilizado:

| | Equipo | Precio/Unidad (€) | Cantidad | | Precio total (€) |
|---|--|-------------------|----------|-----|------------------|
| Fotobiorreactores | <i>Fotobiorreactores Airlift</i> | 623 | 38 | ud. | 23674 |
| | <i>Fotobiorreactores de burbujeo</i> | 317,28 | 10 | ud. | 3172,8 |
| Equipos para la obtención de biomasa | <i>Centrífuga*</i> | 400000 | 1 | ud. | 400000 |
| | <i>Liofilizador*</i> | 45000 | 1 | ud. | 45000 |
| | <i>Compresor</i> | 410 | 1 | ud. | 410 |
| Bombas | <i>Bomba Centrífuga Hasa</i> | 216,85 | 1 | ud. | 216,85 |
| | <i>Bomba Peristáltica II2</i> | 517 | 9 | ud. | 4653 |
| | <i>Bomba peristáltica II7</i> | 560 | 1 | ud. | 1 |
| | <i>Tanque de almacenamiento 2150 L</i> | 929,5 | 2 | ud. | 1859 |
| Tuberías y accesorios | <i>Tuberías PVC</i> | 2,17 | 204 | m | 443,36 |
| | <i>Codos cortos 90° PVC DN40</i> | 10,94 | 48 | ud. | 525,12 |
| | <i>Válvula de bola de 3 vías</i> | 39,5 | 23 | ud. | 908,5 |
| | <i>Válvula de corte</i> | 21,28 | 3 | ud. | 63,84 |
| Lámparas y equipos auxiliares | <i>Esterilizadores</i> | 1512 | 2 | ud. | 3024 |
| | <i>Lámparas UVB</i> | 54,01 | 10 | ud. | 540,1 |
| | <i>Espectrofotómetro</i> | 9979 | 1 | ud. | 9979 |
| | <i>Arcón Congelador</i> | 450,12 | 1 | ud. | 450,12 |
| TOTAL | | | | | 495479,69 |

Tabla P1- Costes de inmovilizado

El precio de los fotobiorreactores se ha estimado teniendo en cuenta sus partes y los materiales de los que están realizados, resultando ser precios aproximados. El coste total de todos los equipos alcanza la cantidad de CUATROCIENTOS NOVENTA Y CINCO MIL CUATROCIENTOS SETENTA Y NUEVE EUROS CON SESENTA Y NUEVE CÉNTIMOS.

Siendo aproximadamente el 80% de dicho presupuesto ocasionado por el elevado precio de la centrífuga. Por este motivo, se debería buscar otro modelo o equipo, más económico, con el fin de ahorrar en gastos.

A estos costes de inmovilizado se le han de aplicar los costes derivados del montaje e instalación de los diferentes equipos en la planta. Para ello, se han de tener en cuenta los factores directos e indirectos, y así poder aplicar la siguiente ecuación, la cual nos permite calcular los costes de los equipos tras su instalación:

$$I_F = I_E * (1 + \sum f_d) * \sum f_i \quad (2)$$

Donde:

- I_F : coste de los equipos tras su instalación (€).
- I_E : coste de los equipos de la planta.
- f_d : factores directos.
- f_i : factores indirectos.

En la siguiente tabla se recogen los factores directos e indirectos que se han de tener en cuenta afectarán a la instalación de los diferentes equipos y accesorios:

| Factores directos, f_d | |
|--|------|
| <i>Mano de obra para la instalación del equipo principal</i> | 0,15 |
| <i>Tuberías y conducciones</i> | 0,5 |
| <i>Protección contra incendios</i> | 0,08 |
| <i>Instalación eléctrica</i> | 0,2 |
| <i>Limpieza</i> | 0,06 |
| <i>Total</i> | 0,99 |

Tabla P2- Factores directos

| Factores indirectos, f_i | |
|--|------|
| <i>Gerencia y gastos generales</i> | 0,3 |
| <i>Diseño e ingeniería</i> | 0,3 |
| <i>Imprevistos</i> | 0,13 |
| <i>Total</i> | 0,73 |

Tabla P3- Factores indirectos

Esto hace que se tengan unos costes totales de:

$$I_F = 495479,69 * (1 + 0,99) * (1 + 0,73) = 1705787,93€$$

Los costes totales de instalación de todos los equipos y requerimientos para el correcto funcionamiento de la planta, ascienden a la cantidad de UN MILLÓN SETECIENTOS CINCO MIL SETECIENTOS OCHENTA Y SIETE EUROS CON NOVENTA Y TRES CÉNTIMOS.

3. Presupuesto de Ejecución por Contrata (PEC)

El Presupuesto de Ejecución por Contrata (PEC) es el importe que cobra el contratista de modo que, al valor de materiales y mano de obra, se le añade la parte proporcional de sus gastos generales y del beneficio económico o beneficio industrial a obtener de la obra.

Se obtiene incrementando el Presupuesto de Ejecución Material en los siguientes conceptos:

- Gastos generales de estructura: del 13 al 17 %, son fijados por cada departamento ministerial, en concepto de gastos generales de la empresa, siendo en este caso del 13%.
- Beneficio industrial del Contratista: fijado en un 6 %.

| CONCEPTO | PRESUPUESTO (€) |
|---|-----------------|
| <i>Presupuesto de Ejecución de Materiales</i> | 1705787,93 |
| <i>Gastos Generales</i> | 221752,43 |
| <i>Beneficio Industrial</i> | 102347,28 |
| <i>Presupuesto de Ejecución por Contrata</i> | 2029787,64 |

Tabla P4- Presupuesto de ejecución por contrata

El presupuesto total tras añadir los Gastos Generales y el Beneficio Industrial del Contratista, asciende a la cantidad de DOS MILLONES VEINTINUEVE MIL SETECIENTOS OCHENTA Y SIETE EUROS CON SESENTA Y CUATRO CÉNTIMOS.

4. Presupuesto de Ejecución General (PEG)

El último factor a tener en cuenta para calcular el presupuesto final es la aplicación del Impuesto sobre el Valor Añadido, IVA, el cual se sitúa en el 21% a fecha de julio de 2019.

De esta manera, se podrá obtener el Presupuesto de Ejecución General.

| CONCEPTO | PRESUPUESTO (€) |
|--|-----------------|
| <i>Presupuesto de Ejecución por Contrata</i> | 2029787,64 |
| <i>IVA</i> | 426276,40 |
| <i>Presupuesto de Ejecución General</i> | 2456064,04 |

Tabla P5- Presupuesto de ejecución general

Añadido el IVA, queda ya estimado el Presupuesto de Ejecución para la instalación de una planta para la producción de *Anabaena sp.* continental con el fin de elaborar un protector solar que la contenga. Dicho presupuesto alcanza el valor de DOS MILLONES CUATROCIENTOS CINCUENTA Y SEIS MIL SESENTA Y CUATRO EUROS CON CUATRO CÉNTIMOS.

Gran parte de este presupuesto está provocado por el elevado precio de la centrífuga, por lo que un método de obtención de biomasa seca, alternativo a este causaría una gran disminución en lo que al Presupuesto General de Ejecución se refiere.

5. Costes anuales

Sin entrar a valorar la viabilidad económica del proceso de producción de *Anabaena sp.* continental, sí se va a hacer una pequeña estimación de los gastos anuales que acarrea todo el proceso de producción. Para ello, se analizarán los gastos en compuestos químicos para el medio de cultivo, los gastos energéticos y los gastos por mano de obra.

5.1- Costes anuales de compuestos químicos para el medio de cultivo

En función de la composición del medio de cultivo de *Anabaena sp.* continental, y el volumen de cultivo tratado anualmente, se ha estimado el consumo de compuestos necesarios para el correcto crecimiento de dicha cianobacteria de acuerdo a las concentraciones de los nutrientes en el medio de cultivo.

Se estimado que, para 30000 L de agua destilada, se necesitan 150 L de cada solución (se podrán preparar más concentradas, requiriendo un menor volumen de agua).

| | | g/L | g total | g/Unidad | Unidades | Precio/Unidad | Total (€) |
|-----------------------|--|--------|---------|---------------|----------|---------------|------------|
| Solución A | <i>KNO₃</i> | 80,880 | 12132 | 5000 | 3 | 498 € | 1.494,00 € |
| | <i>Na₂HPO₄</i> | 5,670 | 850,5 | 1000 | 1 | 188 € | 188 € |
| Solución B | <i>MgSO₄·7H₂O</i> | 49,300 | 7395 | 10000 | 1 | 943,00 € | 943,00 € |
| Solución C | <i>CaCl₂·2H₂O</i> | 22,190 | 3328,5 | 3000 | 4 | 37,90 € | 151,60 € |
| Solución D | <i>C₆H₅FeO₇·5H₂O</i> | 0,526 | 78,89 | 250 | 1 | 76,50 € | 76,50 € |
| | <i>Cl₂Co·6H₂O</i> | 0,002 | 0,36 | 25 | 1 | 45,20 € | 45,20 € |
| | <i>SO₄Cu·5H₂O</i> | 0,002 | 0,37 | 8 | 1 | 0,99 € | 0,99 € |
| | <i>CrO₃</i> | 0,015 | 2,28 | 100 | 1 | 52,40 € | 52,40 € |
| | <i>MnCl₂·4H₂O</i> | 0,198 | 29,69 | 100 | 1 | 44,30 € | 44,30 € |
| | <i>Na₂MoO₄·2H₂O</i> | 0,024 | 3,63 | 100 | 1 | 84,40 € | 84,40 € |
| | <i>SeO₂</i> | 0,001 | 0,17 | 5 | 1 | 43,20 € | 43,20 € |
| | <i>Tiamina</i> | 0,035 | 5,25 | 10 | 1 | 21,10 € | 21,10 € |
| | <i>Cianocobalamina</i> | 0,030 | 4,5 | 100 | 1 | 55,10 € | 55,10 € |
| | <i>Biotina</i> | 0,050 | 7,5 | 1 | 8 | 53,50 € | 428,00 € |
| | <i>EDTA</i> | 0,001 | 0,18 | 0,2 | 1 | 348,00 € | 348,00 € |
| Agua Destilada | | | | 1000 l/Unidad | 30 | 250 | 7.500,00 € |
| CO₂ | | | | 38 kg/Unidad | 3 | 352,72 € | 1.058,16 € |
| TOTAL | | | | | | | 11475,79 € |

Tabla P6- Coste anual de materia prima

Para la preparación del medio de cultivo correspondiente al primer año de funcionamiento de la planta, será necesario realizar un gasto de ONCE MIL CUATROCIENTOS SETENTA Y CINCO EUROS CON SETENTA Y NUEVE CÉNTIMOS.

Este gasto disminuirá los años siguientes, debido a que todos los reactivos están comprados en exceso. Además, tras la centrifugación, el agua obtenida, podría reutilizarse como medio de cultivo, siendo previamente esterilizada, o venderse a otras industrias que pudieran aprovechar este residuo, recuperando, de esta manera, una gran parte del gasto en la preparación del medio de cultivo, ya que al agua destilada necesaria para el cultivo implica 2/3 del gasto total para la preparación de medios.

5.2- Coste anual de consumo energético

Se procede a calcular el coste energético anual de acuerdo a la potencia consumida por cada equipo. Para dicho cálculo es necesario conocer el precio del kW, el cual el 13 de julio es de 0,11233 €/kWh. Además, se ha de estimar las horas de funcionamiento de cada equipo a lo largo de un año.

| Equipo | Potencia consumida (W) | Unidades | Horas por año | Coste anual (€) |
|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|----------------------|------------------------|
| <i>Centrífuga</i> | 1300 | 1 | 720 | 105,14088 |
| <i>Compresor</i> | 250 | 1 | 8760 | 246,0027 |
| <i>Bomba Centrífuga Hasa</i> | 15,7 | 2 | 1080 | 3,80933496 |
| <i>Bomba Peristáltica II2</i> | 1,05 | 9 | 6570 | 6,97417655 |
| <i>Bomba peristáltica II7</i> | 2,5 | 1 | 6570 | 1,84502025 |
| <i>Esterilizadores</i> | 39 | 2 | 2160 | 18,9253584 |
| <i>Lámparas UVB</i> | 26 | 10 | 6570 | 191,882106 |
| <i>Liofilizador</i> | 800 | 1 | 2160 | 194,10624 |
| <i>Arcón Congelador</i> | 180 | 1 | 8760 | 177,121944 |
| TOTAL | | | | 945,81 |

Tabla P7- Coste anual de consumo energético

Todo ese consumo equivale a un gasto anual de NOVECIENTOS CUARENTA Y CINCO OCHENTA Y UN EUROS Y OCHENTA Y UN CÉNTIMOS.

5.3- Coste anual de la mano de obra

Por último, se han de tener en cuenta los gastos que conlleva la contratación de personal cualificado para trabajar en la planta de producción de *Anabaena sp.* continental.

La planta contará con un Ingeniero, dos operarios y un administrativo, suponiendo los siguientes costes.

| Puesto | Nº empleados | Coste anual (€/año) |
|----------------|--------------|---------------------|
| Administrativo | 1 | 18000 |
| Ingeniero | 1 | 36000 |
| Operarios | 2 | 28000 |
| TOTAL | | 82000 |

Tabla P8- Coste anual de mano de obra

De esta manera, con estos gastos anuales en personal, los costes de mano de obra totales son SETENTA Y DOS MIL EUROS.

5.4- Costes anuales totales

Si sumamos los costes totales por mano de obra, por materias primas para la elaboración de los medios de cultivo y los gastos eléctricos, se obtiene que los gastos anuales ascienden a la cantidad de NOVENTA Y CUATRO MIL CUATROCIENTOS VEINTIÚN EUROS CON SESENTA CÉNTIMOS.